UNIVERSIDAD INDOAMÉRICA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MEDIO AMBIENTE

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIODIVERSIDAD Y RECURSOS GENÉTICOS

TEMA:

POSICIÓN FILOGENÉTICA DE *Pristimantis ernesti* PARA CORROBORAR SU ENDEMISMO EN EL PARQUE NACIONAL SUMACO NAPO-GALERAS, ECUADOR

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero en Biodiversidad y Recursos Genéticos

Autor

Minda Toapanta Alexander Isaac

Tutora

PhD. Salerno Patricia

QUITO – ECUADOR

2024

AUTORIZACIÓN POR PARTE DEL AUTOR PARA LA CONSULTA, REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL, Y PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DEL TRABAJO DE TÍTULACIÓN

Yo, Alexander Isaac Minda Toapanta, declaro ser autor del Trabajo de Titulación con el nombre "POSICIÓN FILOGENÉTICA DE *Pristimantis ernesti* PARA CORROBORAR SU ENDEMISMO EN EL PARQUE NACIONAL SUMACO NAPO-GALERAS, ECUADOR", como requisito para optar al grado de Ingeniero en Biodiversidad y Recursos Genéticos y autorizo al Sistema de Bibliotecas de la Universidad Tecnológica Indoamérica, para que con fines netamente académicos divulgue esta obra a través del Repositorio Digital Institucional (RDI-UTI).

Los usuarios del RDI-UTI podrán consultar el contenido de este trabajo en las redes de información del país y del exterior, con las cuales la Universidad tenga convenios. La Universidad Tecnológica Indoamérica no se hace responsable por el plagio o copia del contenido parcial o total de este trabajo.

Del mismo modo, acepto que los Derechos de Autor, Morales y Patrimoniales, sobre esta obra, serán compartidos entre mi persona y la Universidad Tecnológica Indoamérica, y que no tramitaré la publicación de esta obra en ningún otro medio, sin autorización expresa de la misma. En caso de que exista el potencial de generación de beneficios económicos o patentes, producto de este trabajo, acepto que se deberán firmar convenios específicos adicionales, donde se acuerden los términos de adjudicación de dichos beneficios.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Quito a los 6 días del mes de febrero de 2024, firmo conforme:

Autor: Alexander Isaac Minda Toapanta

Firma:

Número de Cédula: 1725152159

Dirección: Pichincha, Quito, Calderón, Llano Grande.

Correo Electrónico: isaacminda15@gmail.com

Teléfono: 0992831361

APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de Tutor del Trabajo de Titulación "POSICIÓN FILOGENÉTICA DE *Pristimantis ernesti* PARA CORROBORAR SU ENDEMISMO EN EL PARQUE NACIONAL SUMACO NAPO-GALERAS, ECUADOR" presentado por Alexander Isaac Minda Toapanta, para optar por el Título de Ingeniero en Biodiversidad y Recursos Genéticos.

CERTIFICO

Que dicho trabajo de investigación ha sido revisado en todas sus partes y considero que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación pública y evaluación por parte del Tribunal Examinador que se designe.

Quito, 06 de febrero del 2024

.....

PhD. Patricia Elena Salerno Domínguez

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Quien suscribe, declaro que los contenidos y los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, como requerimiento previo para la obtención del Título de Ingeniero en Biodiversidad y Recursos Genéticos, son absolutamente originales, auténticos y personales y de exclusiva responsabilidad legal y académica del autor.

Quito, 06 de febrero 2024

……

Alexander Isaac Minda Toapanta

1725152159

APROBACIÓN TRIBUNAL

El trabajo de Titulación, ha sido revisado, aprobado y autorizada su impresión y empastado, sobre el Tema: POSICIÓN FILOGENÉTICA DE *Pristimantis ernesti* PARA CORROBORAR SU ENDEMISMO EN EL PARQUE NACIONAL SUMACO NAPO-GALERAS, ECUADOR, previo a la obtención del Título de Ingeniero en Biodiversidad y Recursos Genéticos, reúne los requisitos de fondo y forma para que el estudiante pueda presentarse a la sustentación del trabajo de titulación.

Quito, 06 de febrero de 2024

……..

PhD. David Salazar

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

…….

Dr. Fabian Santos

VOCAL

DEDICATORIA

A mis queridos padres, Fredd Minda y Sandra Toapanta, deseo expresar mi gratitud por el apoyo inquebrantable y el amor incondicional que han sido la fuerza motriz detrás de mi éxito académico. Cada página de este trabajo de titulación refleja su dedicación y los valores que han inculcado en mí a lo largo de los años. Agradezco por ser mi constante fuente de inspiración, por creer en mí en momentos de duda y por iluminar los momentos más oscuros con su presencia. Este logro no es solo mío, sino también de ustedes, quienes han sido los pilares fundamentales de mi educación. Con profundo cariño, dedico este trabajo a ustedes, mis amados padres.

AGRADECIMIENTO

Queridos Patricia Salerno, Natasha Baer y Fredd Minda, a través de estas líneas, quiero expresar mi profundo agradecimiento por el invaluable apoyo que me brindaron durante el desarrollo de mi trabajo de titulación. Patricia, mi tutora dedicada, quiero agradecerte por tu guía constante y apoyo incansable a lo largo de todo el proceso, tu experiencia y dirección fueron cruciales para dar forma a mi investigación, brindándome perspectivas valiosas y orientación experta. Natasha, tu colaboración en el laboratorio molecular fue esencial para el éxito de mi trabajo, tu habilidad y destreza en la extracción de ADN de mis especies fueron fundamentales para obtener resultados precisos y confiables. Aprecio profundamente tu disposición para compartir tu experiencia y conocimientos. Y Fredd, agradezco sinceramente tu valiosa ayuda en la parte computacional de mi proyecto, tu apoyo técnico y conocimientos informáticos fueron fundamentales para superar desafíos y optimizar los aspectos tecnológicos de mi investigación, tu generosidad al compartir tu tiempo y habilidades fue verdaderamente apreciada. Cada uno de ustedes contribuyó de manera única a mi éxito académico, y estoy sinceramente agradecido por el tiempo, la paciencia y el compromiso que dedicaron a mi proyecto. Este logro no hubiera sido posible sin su generoso apoyo.

INDICE DE CONTENIDOS

PORTADA..... i

AUTORIZACIÓN PARA EL REPOSITORIO DIGITAL..... ii

APROBACIÓN DEL TUTOR..... iii

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD..... iv

APROBACIÓN TRIBUNAL..... v

DEDICATORIA..... vi

AGRADECIMIENTO vii

ÍNDICE DE CONTENIDOS viii

ÍNDICE DE TABLAS …….. x

ÍNDICE DE FIGURAS..... xi

RESUMEN EJECUTIVO..... xii

ABSTRACT..... xiii

CAPÍTULO I

1 INTRODUCCIÓN..... 1

1.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN..... 3

1.2 HIPOTESIS..... 3

1.3 OBJETIVO GENERAL..... 4

1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 4

CAPÍTULO II

2 METODOLOGÍA..... 4

2.1 Área de estudio..... 5

2.2 Extracción y secuenciación de ADN..... 6

2.3 Secuencias genéticas GenBank..... 7

2.4 Alineamiento y edición de secuencias genéticas..... 7

2.5 Filogenia 8
2.6 Distribución de *Pristimantis* 8

CAPÍTULO III

3 RESULTADOS 9

CAPÍTULO IV

4 DISCUSIÓN 15
4.1 Filogenia 15
4.2 Morfología 16
4.3 Conservación 19

CAPÍTULO V

5 CONCLUSIONES 20
6 RECOMENDACIONES 21
7 BIBLIOGRAFÍA 22
8 ANEXOS 28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No. 1. Tabla de rangos de distancias genéticas del gen 12S rRNA entre *P. ernesti* y especies cercanamente emparentadas en las filogenias 13

Tabla No. 2. Tabla de rangos de distancias genéticas del gen 16S rRNA entre *P. ernesti* y especies cercanamente emparentadas en las filogenias 13

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No. 1. Mapa de muestreo de *Pristimantis ernesti* ……..6

Figura No. 2. Árbol de máxima verosimilitud del gen 12s rRNA……....10

Figura No. 3. Árbol de máxima verosimilitud del gen 16s rRNA…….....12

Figura No. 4. Mapa de distribución de *Pristimantis ernesti*, *Pristimantis devillei*, *Pristimantis buckleyi*, *Pristimantis curtipes* y *Pristimantis vertebralis* en Ecuador.....14

Figura No. 5. Fotografías de *Pristimantis*…….18

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA INDOAMÉRICA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MEDIO AMBIENTE

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIODIVERSIDAD Y RECURSOS GENÉTICOS

TEMA: POSICIÓN FILOGENÉTICA DE *Pristimantis ernesti* PARA CORROBORAR SU ENDEMISMO EN EL PARQUE NACIONAL SUMACO NAPO-GALERAS, ECUADOR

AUTOR: Minda Toapanta Alexander Isaac

TUTORA: PhD. Salerno Patricia

RESUMEN EJECUTIVO

Ecuador tiene una gran diversidad de anfibios, un total de 678 especies de las cuales 326 son endémicas, pero tiene una gran cantidad de amenazas. El género *Pristimantis* es abundante y diverso en el Neotrópico, se sabe poco y es complicado de estudiar por su cantidad de diversidad críptica. La especie *Pristimantis ernesti* es conocida únicamente en base a un individuo descrito en 1987 y desde entonces no se había vuelto a encontrar y describir. Por ello, existe incertidumbre sobre si esta especie es válida y endémica del Parque Nacional Sumaco Napo-Galeras. Este trabajo tiene el objetivo de describir la identidad genética de *Pristimantis ernesti* a través de análisis filogenéticos para corroborar si es o no una especie válida y endémica del Parque Nacional Sumaco. Se extrajo y secuenció ADN de 5 individuos asignables a *P. ernesti* y 60 individuos de especies cercanas a *P. ernesti* y otras especies de *Pristimantis* del volcán Sumaco. Además, se descargaron 13 secuencias del gen 12s rRNA y 11 secuencias del gen 16s rRNA y se alinearon con las secuencias obtenidas en laboratorio. Se realizaron inferencias filogenéticas de máxima verosimilitud para cada gen y se observó que *P. ernesti* en efecto constituye un linaje monofilético, con niveles medios y altos de soporte de bootstrap. Los resultados respaldan que *P. ernesti* es una especie valida y endémica del Volcán Sumaco, destacando su importancia para la conservación de la biodiversidad. Debido a que las divergencias con los grupos más cercanos a *P. ernesti* que son *P. buckleyi*, *P. curtipes* y *P. vertebralis*, no son muy altas en los fragmentos de genes estudiados, se necesitan más estudios para saber cuál es el grupo más cercano. Los hallazgos subrayan la necesidad de continuar investigando y protegiendo las especies endémicas en áreas protegidas como el Parque Nacional Sumaco Napo-Galeras.

DESCRIPTORES: 12s rRNA, 16s rRNA, Filogenia, *Pristimantis ernesti*

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA INDOAMÉRICA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MEDIO AMBIENTE

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIODIVERSIDAD Y RECURSOS GENÉTICOS

THEME: PHYLOGENETIC POSITION OF *Pristimantis ernesti* TO CORROBORATE ITS ENDEMISM IN SUMACO NAPO-GALERAS NATIONAL PARK, ECUADOR

AUTHOR: Minda Toapanta Alexander Isaac

TUTOR: PhD. Salerno Patricia

ABSTRACT

Ecuador has a great diversity of amphibians, a total of 678 species of which 326 are endemic, but this diversity is highky theratened. The genus *Pristimantis* is abundant and diverse in the Neotropics, but because of the amount of cryptic diversity and few studies done, much work is needed. The species *Pristimantis ernesti* was described in 1987 based only on one specimen and has not been found and described since. Therefore, there is uncertainty as to whether this species is valid and endemic to the Sumaco Napo-Galeras National Park. This work aims to describe the genetic identity of *Pristimantis ernesti* through phylogenetic analyses to corroborate whether or not it is an endemic species of Sumaco National Park. DNA was extracted and sequenced from 5 individuals of *P. ernesti* and 60 additional individuals of species close to *P. ernesti* and other *Pristimantis* species from Sumaco Volcano. In addition, 13 sequences of the 12s rRNA gene and 11 sequences of the 16s rRNA gene were downloaded and aligned with the sequences obtained in the laboratory. Maximum likelihood phylogenetic inferences were made for each gene, and it was observed that *P. ernesti* constitutes a monophyletic lineage, with medium and high levels of bootstrap support. The results support that *P. ernesti* is a valid species endemic to Sumaco Volcano, highlighting the importance of its conservation. Because divergences with *P. ernesti*'s closest groups, *P. buckleyi*, *P. curtipes* and *P. vertebralis*, are not very high in the gene fragments studied, further work is needed to determine the closest group. These findings highlight the need for continued research and protection of endemic species in protected areas such as Sumaco Napo-Galeras National Park.

KEYWORDS: 12s rRNA, 16s rRNA, Phylogeny, *Pristimantis ernesti*

CAPÍTULO I

1 INTRODUCCIÓN

Ecuador es el país con mayor biodiversidad por unidad de superficie del mundo debido a su gran variedad de hábitats (Marchese, 2015; Mestanza et al., 2020; Székely et al., 2020). Con tan solo el 0,06 % de la superficie terrestre global, posee un total de 678 especies de anfibios de las cuales 326 son endémicas (Ron et al., 2022a). Los anfibios son importantes ya que tienen diversos roles como: mantenimiento de la estabilidad y resiliencia de los ecosistemas; dinámica de minerales y nutrientes; formar parte esencial de la red alimentaria y dinámica energética; indicador ambiental de calidad y salud de los ecosistemas; entre otros (West, 2018). A pesar de ello, este grupo se encuentra altamente amenazado por múltiples causas como son la pérdida de hábitats, la expansión de la frontera agrícola y ganadera, la expansión urbana, la construcción de infraestructura, las actividades mineras y petroleras, el cambio climático y las enfermedades (Ortega et al., 2021). Según la UICN (2024), en Ecuador el 12,8 % de anfibios se encuentran vulnerables, el 20,4 % en peligro y el 14,1 % en peligro crítico de extinción.

A pesar de las amenazas, en los últimos años en Ecuador existe un promedio de 15 descripciones anuales de especies de anfibios y aún quedan muchas más por describir (Ron et al., 2022b). Los anfibios son un grupo muy difícil de estudiar, a nivel taxonómico, debido a que existe una gran cantidad de diversidad críptica. Por ello, la clasificación de algunas familias, géneros y especies sigue siendo controvertida, por lo que se debe llevar a cabo una investigación integrada en profundidad, incluida la recopilación de datos ecológicos básicos y el análisis integrado de datos genéticos y morfológicos, para ayudar a profundizar la comprensión de los mecanismos e historia de especiación de las especies (Kai et al., 2020). Además de ello, la información de ciertos registros de especies está basada en literatura antigua, la cual contiene

datos cuestionables, pero debido a la falta de estudios y de material comparativo, no se conoce la validez de muchas especies de anfibios que han sido descritos (Chen et al., 2017), sin contar los muchos que aún quedan por describir.

Pristimantis es un género de ranas de desarrollo directo perteneciente a la familia Strabomantidae, orden Anura, clase Amphibia y filo Chordata. Alrededor del Neotrópico poseen un total de 591 especies y en Ecuador existen 259 (43,8 % del total de ranas del Neotrópico) especies de las cuales 162 son endémicas (Reyes & Mancero, 2022; Ron et al., 2022a). Un mayor enfoque en técnicas moleculares, acústicas y morfológicas combinado con un aumento significativo en los esfuerzos de muestreo ha llevado a un aumento en el número de especies recientemente descritas, lo que permite realizar más investigaciones para comprender su taxonomía y sistemática (Gonzalez et al., 2017). Sin embargo, de todas las especies de *Pristimantis* descritas, el 36,8 % se encuentra en las categorías No evaluadas o Datos insuficientes de la lista roja mundial de la UICN. En los últimos 20 años, el aumento en las tasas de descripción de especies en América Latina ha puesto en evidencia la diversidad y endemismo de *Pristimantis,* al mismo tiempo que ha dejado ver los complejos patrones de especiación que están teniendo lugar. Ecuador en relación a este género tiene la tasa más alta de descripción por año (3,9 %). Dada la naturaleza críptica que se encuentra en los miembros de este género, el trabajo para descubrir y describir nuevas especies parece estar lejos de terminar (Reyes & Mancero, 2022).

Pristimantis ernesti, conocida como la rana ladrona de Ernest, es una especie descrita por Glenn Flores en 1987, y es endémica del Parque Nacional Sumaco Napo-Galera, lo que significa que su distribución conocida se limita a esta zona. La especie fue descrita por primera vez como *Eleutherodactylus ernesti* y posteriormente fue reclasificada como *Pristimantis ernesti*. La

descripción original sugiere que el grupo hermano de *P. ernesti* es *P. devillei* , sin embargo se realizó basándose en un único individuo, macho adulto, el cual fue recolectado en la cumbre del volcán Sumaco a 3900 msnm, en el año 1979 (Flores, 1987). Como sugiere la descripción original, pareció existir una deficiente preservación y además, al ser colectada 8 años antes de ser descrita, resultó en una pérdida de pigmentación. Por ello, la validez de esta especie es cuestionable debido a las condiciones en las que fue realizada y a la falta de investigación tanto morfológica, ecológica y genética. Por lo descrito con anterioridad nace la incertidumbre y la pregunta de estudio, ¿es *Pristimantis ernesti* una especie válida y endémica del Parque Nacional Sumaco Napo-Galeras?, y para responder esta preguntan se platean dos hipótesis. H1: *P. ernesti* es una especie cercana a *P. devillei*. H2: *P. ernesti* es una especie única y endémica del Parque Nacional Sumaco. Al responder esta pregunta, se estará contribuyendo de manera importante al conocimiento de los anfibios del Ecuador, y en particular a los anfibios del Volcán Sumaco, el cual es de enorme importancia debido a su geografía y geología, y no ha recibido suficiente atención de investigadores locales e internacionales.

1.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Es *Pristimantis ernesti* una especie válida y endémica del Parque Nacional Sumaco Napo-Galeras, Ecuador?

1.2 HIPOTESIS

H1: *P. ernesti* es una especie cercana a *P. devillei*.

H2: *P. ernesti* es una especie única y endémica del Parque Nacional Sumaco.

1.3 OBJETIVO GENERAL

Describir la identidad genética de *Pristimantis ernesti* a través de análisis filogenéticos para corroborar su validez como especie y su endémismo del Parque Nacional Sumaco Napo-Galeras, Ecuador.

1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener secuencias del gen 12S rRNA y 16s rRNA de *Pristimantis ernesti* y otras especies cercanas de *Pristimantis.*
- Generar alineamientos de las secuencias obtenidas de *Pristimantis* y de secuencias relevantes de *Pristimantis* descargadas de GenBank.
- Obtener un árbol filogenético de máxima verosimilitud para evaluar si *Pristimantis ernesti* se trata de una especie endémica del Parque Nacional Sumaco Napo-Galeras, o por lo contrario si se trata de un sinónimo de otra especie de amplia distribución.

CAPÍTULO II

2 METODOLOGÍA

El tipo de investigación empleado en este trabajo fue cuantitativo debido a que se utilizan secuencias genéticas y se realizan árboles filogenéticos con soportes estadísticos, en donde las distancias genéticas nos ayudan a estimar cuan distintas son las secuencias entre sí. Adicionalmente es un trabajo de investigación correlacional y explicativo porque se relaciona a *Pristimantis erneti* con otros *Pristimantis* para saber su identidad genética y se explica el endemismo de la especie con ayuda de los análisis filogenéticos.

2.1 Área de estudio

Este estudio se realizó con cinco individuos asignados morfologicamente a *Pristimantis ernesti* recolectados en el Parque Nacional Sumaco Napo-Galeras, tres colectados en el cráter el volcán Sumaco a 3751 msnm y dos colectados en las faldas del volcán Sumaco a 3295 msnm como se observa en la Figura 1. Esta área protegida está ubicada en las provincias de Napo y Orellana con una extensión de 205.751 hectáreas y un rango altitudinal que va de los 500 msnm a los 3.990 msnm. Este parque fue declarado Reserva de Biosfera en el año 2000 por la UNESCO. La reserva está conformada por dos bloques. El primer bloque es el más grande y contiene al volcán Sumaco, el Cerro Negro y el Cerro Pan de Azúcar. El segundo es más pequeño y contiene la cordillera Napo-Galeras. Dentro de esta área podemos encontrar: bosques húmedos tropicales en las zonas bajas, bosques montanos en los cerros y montañas, y páramo en la cumbre del volcán Sumaco (MAE, 2015).

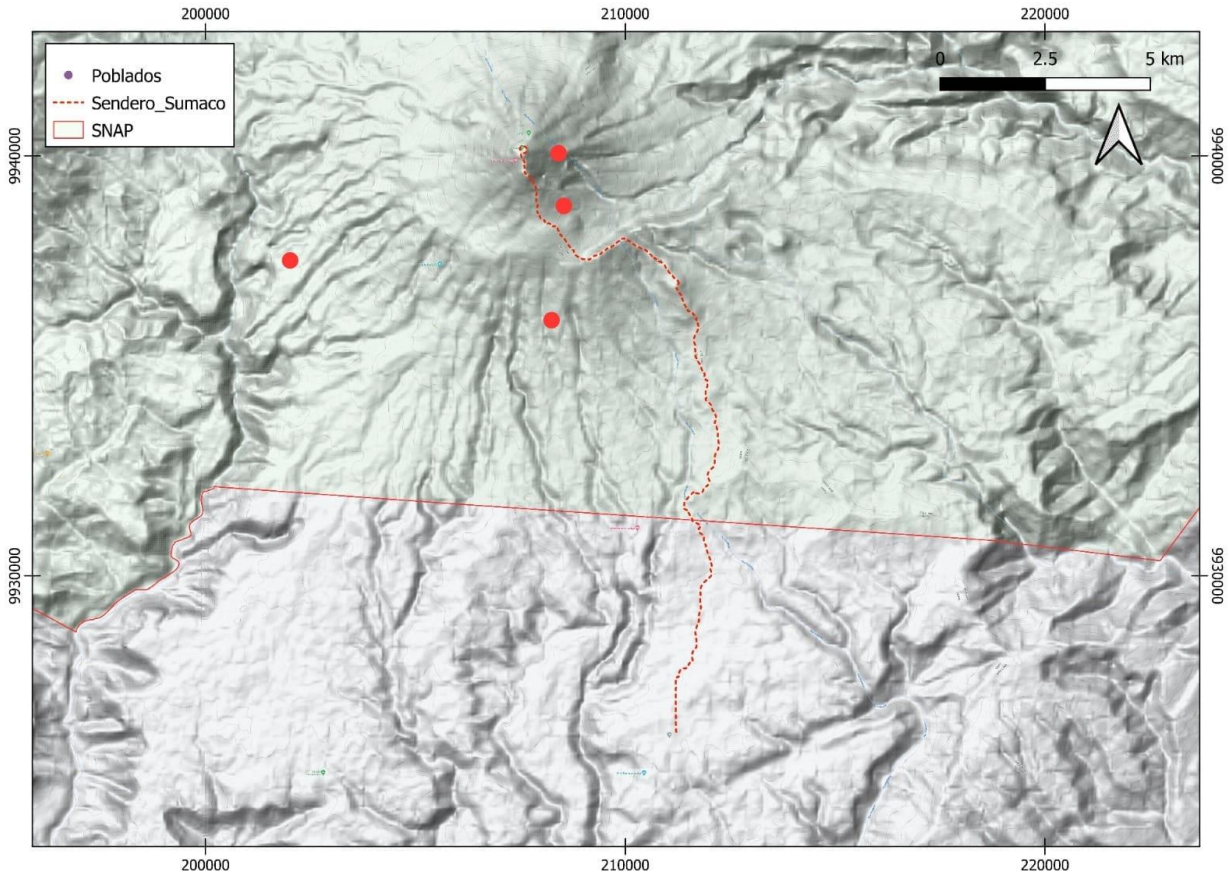

Figura 1: Mapa de muestreo de *Pristimantis ernesti*. Mapa del volcán Sumaco. *P. ernesti* punto rojo.

2.2 Extracción y secuenciación de ADN

Para la extracción, secuenciación y amplificación de ADN genómico se usaron 30mg de tejido de los hígados de *Pristimantis* preservados en etanol al 96 % y se los trituró. Se extrajo ADN de un total de 5 individuos asignables a *Pristimantis ernesti* y 60 individuos adicionales de especies cercanas a *P. ernesti* y de otras especies de *Pristimantis* del volcán Sumaco. Para la extracción se utilizó el kit comercial de la marca (E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit Omega Bio-Tek) siguiendo los pasos del protocolo establecido. Se realizó PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) para amplificar fragmentos de los genes 12S rRNA y 16S rRNA; para 12S se

utilizaron los primers L1091 (AAACTGGGATTAGATACCCCACTAT) y H1557 (GTACACTTACCTTGTTACGACTT), y para 16S se usaron los primers 16Sc-F (GTRGGCCTAAAAGCAGCCAC) y 16Sbr-H-R (CCGGTCTGAACTCAGATCACGT). Las concentraciones utilizadas en cada reacción fueron las siguientes: 0.2 µM de cada primer, 1 mM de MgSO4, 0.2 µM de dNTPs, 1X buffer PCR, 0.75 U de Taq ADN polimerasa (Applied Biological Materials Inc.) y ~50 ng de DNA, en un volumen total de 25 µL. El programa de PCR utilizado fue: denaturación inicial de 3 minutos a 94 °C, 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 57 °C para 12S y 60 °C para 16S, 1 minuto a 72 °C y una extensión final de 10 minutos a 72 °C. Los productos PCR fueron observados en un gel de agarosa al 1.5 % y posteriormente se enviaron a Macrogen en Corea para su secuenciación Sanger.

2.3 Secuencias genéticas GenBank

Basándonos en especies cercanas a *P. ernesti*, se realizó una búsqueda en la página web National Center for Biotechnology Infromation (NCBI) de GenBank (NCBI, 1988) donde se puede acceder a secuencias genéticas de diferentes especímenes. Se realizaron descargas separadas de 13 secuencias de ADN ribosomal con el gen 12S y 11 secuencias de ADN ribosomal con el gen 16S.

2.4 Alineamiento y edición de secuencias genéticas

Una vez obtenidas las secuencias de Macrogen y descargadas las secuencias de GenBank, colocamos todas las secuencias genéticas obtenidas en un solo archivo, utilizando el editor de texto Sublime Text (Sublime HQ, 2023). Luego ese archivo se lo subió al programa en línea de alineamiento Clustal Omega (Madeira et al., 2022) donde se obtuvo un alineamiento cortado, el cual se lo pasó al editor de texto y se lo guardó con la extensión .nex. Este último archivo .nex, lo abrimos en el programa Mesquite versión 3.81 (Maddison & Maddison, 2023) en donde

realizamos la edición de manera manual de los alineamientos obtenidos con anterioridad, para así resolver regiones altamente variables o con alta cantidad de datos faltantes (mayor al 90 %). Finalmente, se editó manualmente el archivo de alineamiento en el programa Sublime Text para generar un archivo en formato phylip para ser usado en las inferencias filogenéticas.

2.5 Filogenia

Antes de la inferencia filogenética estimamos el modelo de evolución de nucleótidos usando el programa jModelTest2 (Darriba et al., 2012). Luego usamos el programa RAxML (Stamatakis, 2014) para estimar un árbol de máxima verosimilitud usando el modelo apropiado. Para ello, se escogió el mejor de 20 árboles de máxima verosimilitud, y luego se hicieron 1000 repeticiones de bootstraps. Los bootstraps son un método estadístico el cual se utiliza para evaluar la confiabilidad de las ramas en un árbol filogenético. Este método consiste en realizar múltiples réplicas de muestreo con reemplazo a partir de los datos originales y construir árboles filogenéticos para cada réplica. Además, ayuda a evaluar la frecuencia con la que una determinada agrupación de especies aparece en los árboles, lo que proporciona una estimación de la robustez en el árbol final (Pérez et al., 2024).

2.6 Distribución de *Pristimantis*

A raíz de los árboles filogenéticos inferidos en este estudio, se verificaron los puntos de distribución de las especies más emparentadas a *P. ernesti*, así como de *P. devillei*, obteniendo registros disponibles en la base de datos GBIF (GBIF.org., 2024), los cuales fueron registrados por Museo de Zoología QCAZ de la PUCE (PUCE, 2024). Y se realizó un mapa de distribución con ayuda del programa QGIS versión 3.36 (QGIS.org, 2024).

CAPÍTULO III

3 RESULTADOS

Se obtuvo un alineamiento editado para el gen 12S rRNA de 453 pares de base (pb) y 57 secuencias genéticas de *Pristimantis*, 44 obtenidas en laboratorio y 13 de GenBank, y un alineamiento para el gen 16S rRNA de 910 pb y 67 secuencias genéticas de *Pristimantis*, 56 obtenidas en laboratorio y 11 de GenBank.

Se obtuvieron dos árboles filogenéticos uno del gen 12s que se muestra en la Figura 2 y por otro del gen 16s que se muestra en la Figura 3. Los árboles incluyen varias especies y muestra cómo están relacionadas entre sí. Para ambos genes estudiados *P. ernesti* representa un linaje monofilético al estar agrupado en una sola rama del árbol con un soporte del 89 % y 60 % respectivamente, como se observa en la Figura 2 y 3. Por otro lado, en la Figura 2 y 3 los *Pristimantis* que están en la parte superior del árbol, resuelven las diferencias de mejor manera, ya que, los soportes son más altos, hay más mutaciones y hay más distancia genética entre esas especies.

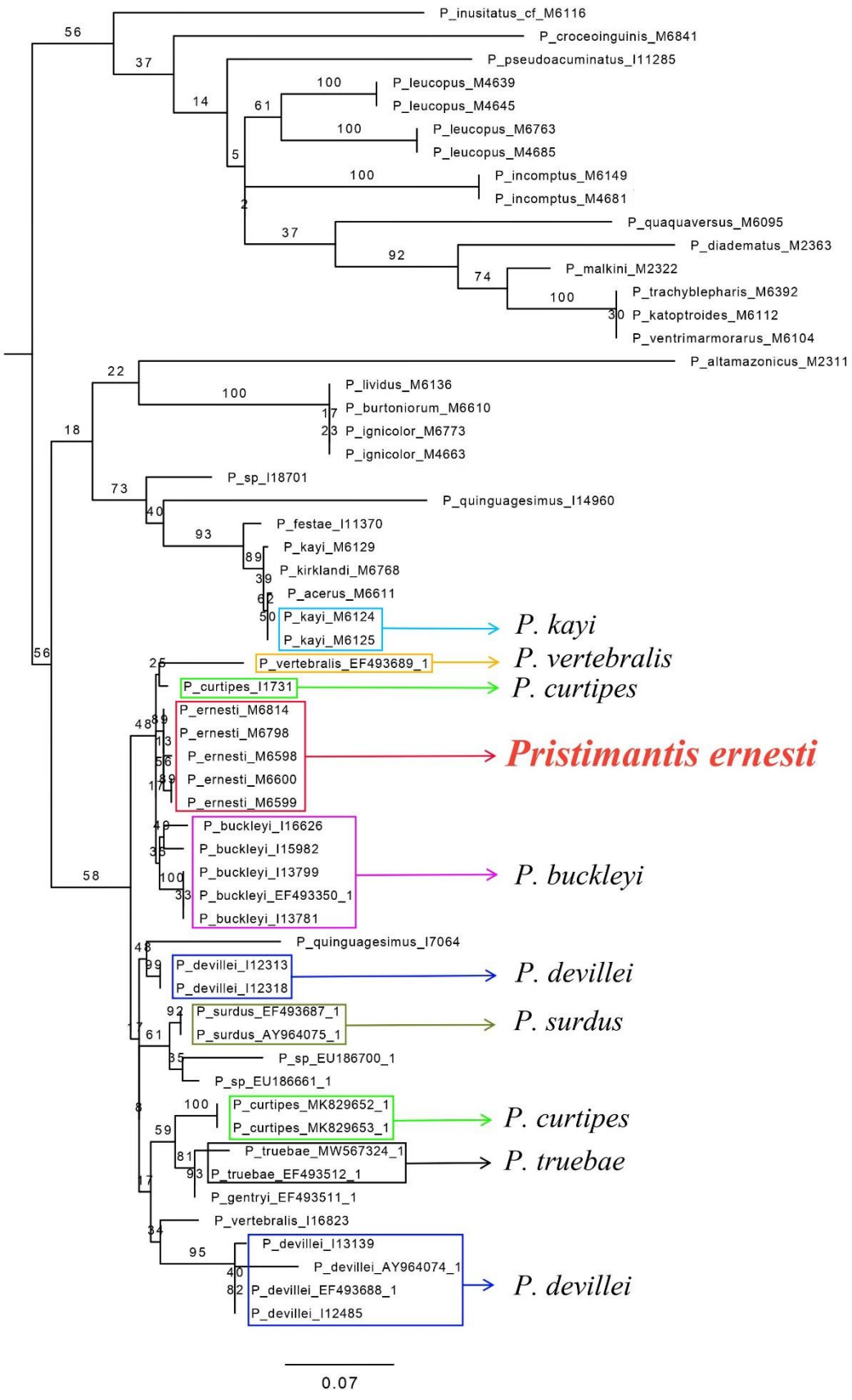
P_inusitatus_cf_M6116
P_croceoinguinis_M6841
P_pseudoacuminatus_I11285
P_leucopus_M4639
P_leucopus_M4645
P_leucopus_M6763
P_leucopus_M4685
P_incomptus_M6149
P_incomptus_M4681
P_quaquaversus_M6095
P_diadematus_M2363
P_malkini_M2322
P_trachyblepharis_M6392
P_katoptroides_M6112
P_ventrimarmorarus_M6104
P_altamazonicus_M2311
P_lividus_M6136
P_burtoniorum_M6610
P_ignicolor_M6773
P_ignicolor_M4663
P_sp_I18701
P_quinguagesimus_I14960
P_festae_I11370
P_kayi_M6129
P_kirklandi_M6768
P_acerus_M6611
P_kayi_M6124
P_kayi_M6125
P. kayi
P_vertebralis_EF493689_1
P. vertebralis
P_curtipes_I1731
P. curtipes
P_ernesti_M6814
P_ernesti_M6798
P_ernesti_M6598
P_ernesti_M6600
P_ernesti_M6599
Pristimantis ernesti
P_buckleyi_I16626
P_buckleyi_I15982
P_buckleyi_I13799
P_buckleyi_EF493350_1
P_buckleyi_I13781
P. buckleyi
P_quinguagesimus_I7064
P_devillei_I12313
P_devillei_I12318
P. devillei
P_surdus_EF493687_1
P_surdus_AY964075_1
P. surdus
P_sp_EU186700_1
P_sp_EU186661_1
P_curtipes_MK829652_1
P_curtipes_MK829653_1
P. curtipes
P_truebae_MW567324_1
P_truebae_EF493512_1
P. truebae
P_gentryi_EF493511_1
P_vertebralis_I16823
P_devillei_I13139
P_devillei_AY964074_1
P_devillei_EF493688_1
P_devillei_I12485
P. devillei
0.07

Figura 2: Árbol de máxima verosimilitud del gen 12s rRNA. Obtenido con 1.000 bootstraps mediante RAxML. Los valores en las ramas de los árboles representan los porcentajes de bootstraps, y la escala de abajo representa un numero de sustituciones por base (nucleótido) de 0,07.

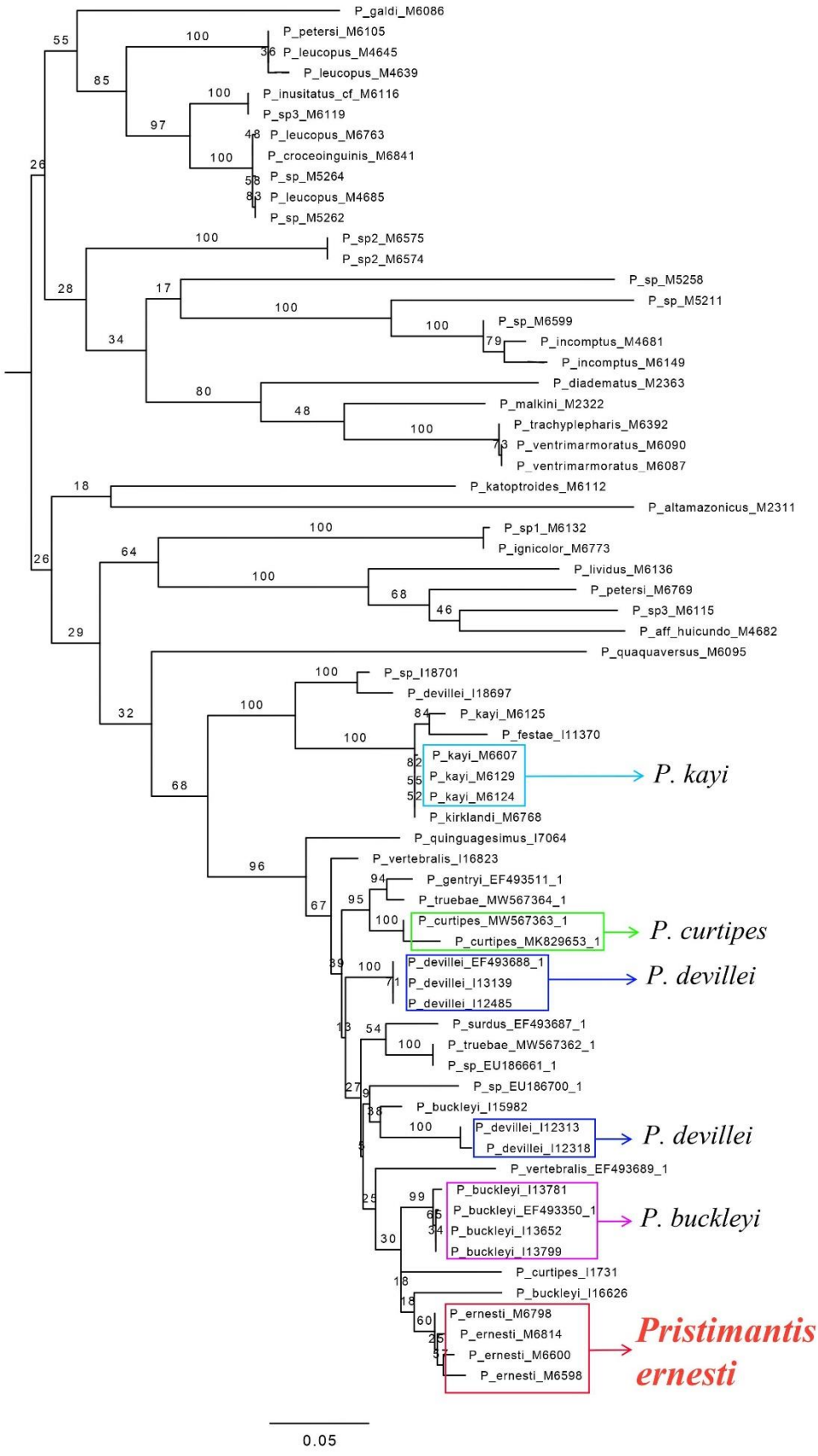
P_galdi_M6086
P_petersi_M6105
P_leucopus_M4645
P_leucopus_M4639
P_inusitatus_cf_M6116
P_sp3_M6119
P_leucopus_M6763
P_croceoinguinis_M6841
P_sp_M5264
P_leucopus_M4685
P_sp_M5262
P_sp2_M6575
P_sp2_M6574
P_sp_M5258
P_sp_M5211
P_sp_M6599
P_incomptus_M4681
P_incomptus_M6149
P_diadematus_M2363
P_malkini_M2322
P_trachyplepharis_M6392
P_ventrimarmoratus_M6090
P_ventrimarmoratus_M6087
P_katoptroides_M6112
P_altamazonicus_M2311
P_sp1_M6132
P_ignicolor_M6773
P_lividus_M6136
P_petersi_M6769
P_sp3_M6115
P_aff_huicundo_M4682
P_quaquaversus_M6095
P_sp_I18701
P_devillei_I18697
P_kayi_M6125
P_festae_I11370
P_kayi_M6607
P_kayi_M6129
P_kayi_M6124
P. kayi
P_kirklandi_M6768
P_quinguagesimus_I7064
P_vertebralis_I16823
P_gentryi_EF493511_1
P_truebae_MW567364_1
P_curtipes_MW567363_1
P_curtipes_MK829653_1
P. curtipes
P_devillei_EF493688_1
P_devillei_I13139
P_devillei_I12485
P. devillei
P_surdus_EF493687_1
P_truebae_MW567362_1
P_sp_EU186661_1
P_sp_EU186700_1
P_buckleyi_I15982
P_devillei_I12313
P_devillei_I12318
P. devillei
P_vertebralis_EF493689_1
P_buckleyi_I13781
P_buckleyi_EF493350_1
P_buckleyi_I13652
P_buckleyi_I13799
P. buckleyi
P_curtipes_I1731
P_buckleyi_I16626
P_ernesti_M6798
P_ernesti_M6814
P_ernesti_M6600
P_ernesti_M6598
Pristimantis ernesti
0.05

Figura 3: Árbol de máxima verosimilitud del gen 16s rRNA. Obtenido con 1.000 bootstraps mediante RAxML. Los valores en las ramas de los árboles representan los porcentajes de bootstraps, y la escala de abajo representa un numero de sustituciones por base de 0,05.

Tabla 1: Tabla de rangos de distancias genéticas del gen 12s rRNA entre *P. ernesti* y especies cercanamente emparentadas en las filogenias. Los porcentajes nos muestran el rango de la diferencia entre dos especies (estimado a partir de todos los pares de individuos). Distancias genéticas de todos los individuos del gen 12s en Anexo 1.

Especies	**Rango de distancias genéticas**
P. ernesti - P. devillei	3,2% - 8,2%
P. ernesti - P. buckleyi	2% - 2,9%
P. ernesti - P. vertebralis	5,1% - 5,9%
P. ernesti - P. curtipes	1,1% - 5,6%

Tabla 2: Tabla de rangos de distancias genéticas del gen 16s rRNA entre *P. ernesti* y especies cercanamente emparentadas en las filogenias. Los porcentajes nos muestran el rango de la diferencia entre dos especies (estimado a partir de todos los pares de individuos). Distancias genéticas de todos los individuos del gen 16s en Anexo 2.

Especies	**Rango de distancias genéticas**
P. ernesti - P. devillei	4% - 7,3%
P. ernesti - P. buckleyi	2,8% - 4,7%

P. ernesti - P. vertebralis	7% - 8%
P. ernesti - P. curtipes	3,3% - 4,7%

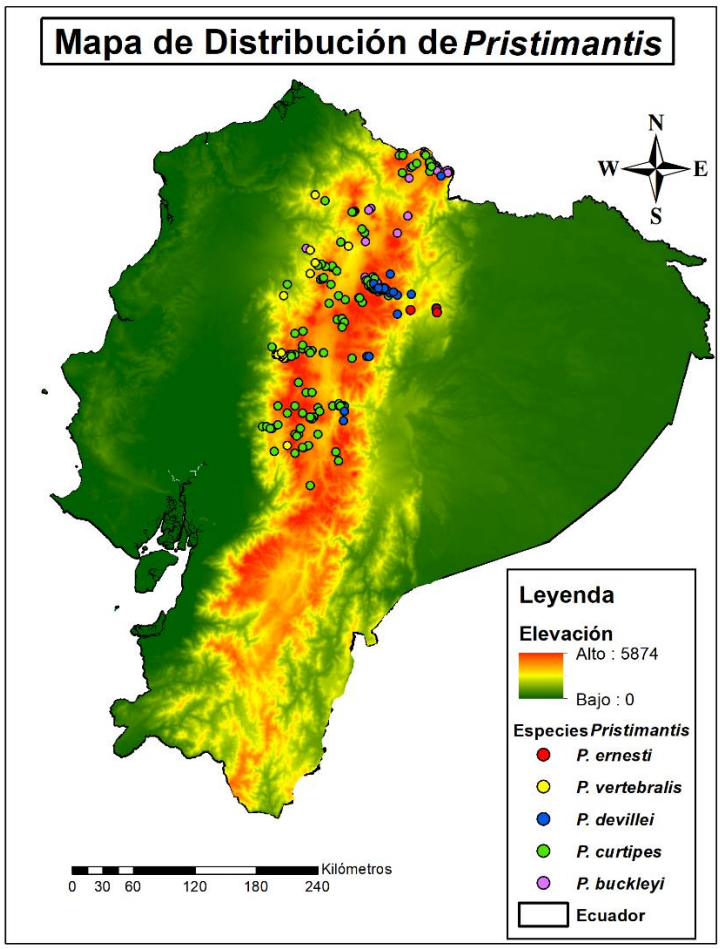

Figura 4: Mapa de distribución de *Pristimantis ernesti*, *Pristimantis devillei*, *Pristimantis buckleyi*, *Pristimantis curtipes* y *Pristimantis vertebralis* en Ecuador. Punto rojo *P. ernesti*, punto azul *P. devillei*, punto rosa *P. buckleyi*, punto verde *P. curtipes* y punto amarrillo *P. vertebralis*. Los datos de distribución de estas especies fueron obtenidos de GBIF.org (https://www.gbif.org/occurrence/search).

CAPÍTULO IV

4 DISCUSIÓN

4.1 Filogenia

En el árbol del gen 12s, el grupo de interés, *Pristimantis ernesti*, es monofilético y tiene un buen soporte de bootstraps del 89 %, el cual nos dice que las secuencias utilizadas en la construcción del árbol filogenético respaldan que *P. ernesti* forma un grupo o clado único y por lo tanto se valida su identidad genética. Similarmente, en el árbol del gen 16s, aunque con un soporte menor de bootstraps del 60 %, también se evidencia que *P. ernesti* forma un grupo o clado único y, por lo tanto, también se valida su identidad genética. Adicionalmente, en las tablas de rangos de distancias genéticas del gen 12s y 16s (Tabla 1 y 2) se observa que *P. ernesti* está más emparentado con *P. buckleyi* y *P. curtipes*, y *P. devillei* es la menos emparentada. Gracias a todo lo mencionado anteriormente se acepta la hipótesis de que *P. ernesti* es una especie única y endémica del Parque Nacional Sumaco.

En la descripción original de *P. ernesti* la se sugiere que su grupo hermano es *P. devillei* (Flores, 1987); sin embargo, con ayuda de los árboles de los genes 12s y 16s (Figura 2 y 3) y con los cuadros de rangos de distancias genéticas (Tabla 1 y 2) se rechaza la hipótesis de que *P. ernesti* es una especie cercana a *P. devillei*, debido a que en los árboles *P. devillei*. Además, se observa que lo más probable es que el grupo hermano de *P. ernesti*, sea *P. buckleyi*, *P. curtipes* o *P. vertebralis*, y en las tablas de rangos de distancias genéticas (Tabla 1 y 2) se observa que *P. ernesti* está más emparentado con *P. buckleyi* con un rango de distancias genéticas de 2 % a 2,9 % del gen 12s y de 2,8 % a 4,7 % del gen 16s. Y se observa que está menos emparentado a *P. vertebralis* con un rango de distancias genéticas de 5,1 % a 5,9 % del gen 12s y de 7 % a 8 % del gen 16s. Sin embargo, en el árbol del gen 12s y 16s (Figura 2 y 3), se observa un bajo soporte de

bootstraps del 48 % y 25 % respectivamente, y en el árbol del gen 12s se observa una politomia para la rama que sostiene a estos linajes, lo que nos dice que todavía no están resueltas las relaciones entre estos grupos y no están bien respaldadas por las secuencias utilizadas en la construcción de los árboles filogenéticos. Sin embargo, ambas inferencias filogenéticas (12s y 16s) coinciden en que las especies más emparentadas a *P. ernesti* son *P. buckleyi*, *P. curtipes y P. vertebralis*. Por otro lado, estas especies, como se ve en la Figura 4 no están en el rango de distribución de *P. ernesti*. Además, surge la hipótesis que, *P. ernesti* es más afín a grupos andinos de lo que es a *P. devillei*, lo que podría indicar que sufrieron un proceso de especiación alopátrica a lo largo del tiempo. Esta hipótesis podría ser resuelta más adelante y con más estudios que la respalden.

4.2 Morfología

Pristimantis ernesti y *P. devillei*, según la literatura (Flores, 1987), morfológicamente son especies marcadamente diferentes. *P. ernesti* se caracteriza por una piel glandular y picada con prominentes crestas dorsolaterales, numerosas verrugas glandulares en los flancos y pequeñas manchas circulares de glándulas en la axila, la ingle y en la parte distal posterior del muslo. También tiene párpados glandulares prominentes, tubérculos cubitales, talones pareados y tubérculos subanales pareados, y una forma de cabeza distintiva con un canto cóncavo bien definido, una región loreal muy cóncava, labios acampanados y hocico inclinado dorsalmente anteroventral. *P. devillei* tiene la piel del dorso lisa, crestas dorsolaterales y crestas craneales, el hocico redondeado de perfil, el canto rostral no es cóncavo y carece de tubérculos en el párpado superior, el talón y debajo del ano. Aunque *P. devillei* comparte crestas dorsolaterales y crestas craneales con *P. ernesti* por lo demás estas especies son diferentes. Dadas las nuevas colecciones

de *P. ernesti*, estos especímenes serán analizados morfológicamente para así registrar la variación presente en la especie.

P. ernesti además presenta claras diferencias morfológicas con las especies genéticamente más cercanas. *P. buckleyi* tiene la piel del dorso lisa, mientras que la del vientre es areolada, presenta pliegues dorsolaterales, el hocico es acuminado en vista dorsal e inclinado en perfil lateral, el espacio interorbital es mayor que la anchura del párpado, y las crestas frontoparietales son prominentes, el antebrazo presenta una hilera de tubérculos poco definida a lo largo del borde externo, y el pliegue tarsiano interno está presente pero no es prominente, el dorso es marrón con chevrones y motas negras, el vientre es crema con reticulaciones marrones, y la superficie posterior del muslo es amarillo-marrón pálido con reticulaciones marrones (Lynch, 1969). *P. curtipes* tiene la piel de la cabeza lisa y la cabeza es más estrecha que el cuerpo, más ancha que larga. La piel del dorso presenta verrugas bajas y planas, más evidentes en la parte posterior y flancos. Los pliegues dorsolaterales no son prominentes. El vientre es áreolé y presenta pliegues discoidales notables. El hocico es redondeado a obtuso en vista dorsal, redondeado a inclinado en perfil lateral, ligeramente sobresaliente sobre la mandíbula inferior. El tímpano es visible, redondo a ligeramente más alto que largo. No presenta crestas craneales ni tubérculos en el párpado. No hay tubérculos en la rodilla, talón o borde externo del tarso. En el borde interno del tarso hay un tubérculo indistinto. El tubérculo metatarsiano interno es ovalado y más grande que el tubérculo externo (Lynch, 1981). Y *P. vertebralis* tiene la piel de la cabeza y la parte anterior de la espalda es áspera, volviéndose más verrugosa hacia la parte posterior. Presenta pliegues dorsolaterales completos. Los flancos superiores son verrugosos, mientras que los inferiores son areolados. El vientre es areolado. El hocico es corto, las fosas nasales son prominentes y dirigidas dorsolateralmente. La región loreal es débilmente cóncava y desciende

abruptamente hacia los labios. El borde superior del párpado es ancho, con pequeñas verrugas no punzantes a lo largo del borde posterior. Presenta tubérculos en el talón y en el borde externo del tarso. Tiene un tubérculo tarsal interno en lugar de un pliegue (Lynch, 1979). Los detalles morfológicos de estos *Pristimantis* se pueden evidenciar en la Figura 5.

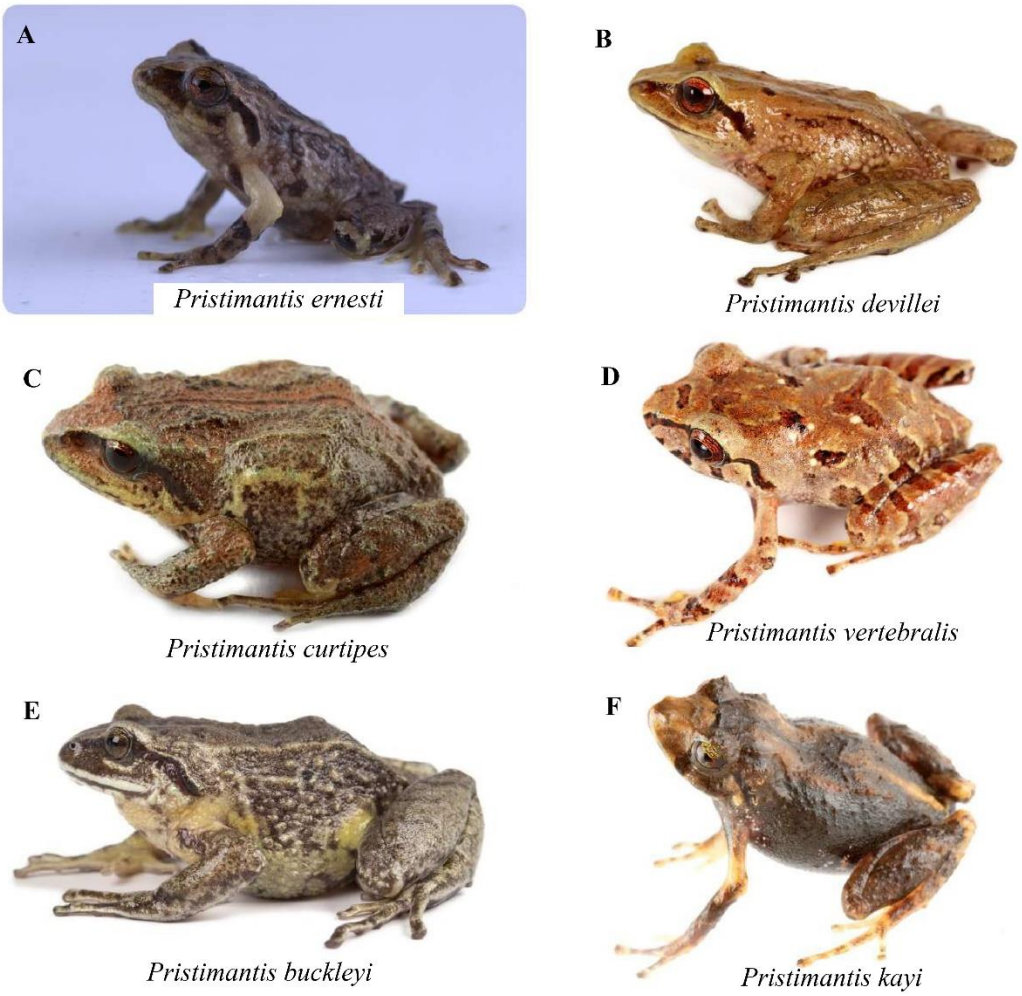

Figura 5: Fotografías de *Pristimantis* discutidas en el presente trabajo. Fotografías de (A) *Pristimantis ernesti*, (B) *Pristimantis devillei*, (C) *Pristimantis curtipes*, (D) *Pristimantis vertebralis*, (E) *Pristimantis buckleyi* y (F) *Pristimantis kayi*. Fotografías de *P. devillei*, *P.*

buckleyi, P. curtipes, P. vertebralis y *P. kayi* obtenidas de la BIOWEB (https://bioweb.bio). Fotografía de *P. ernesti* tomada por J.P. Reyes-Puig.

Respecto a sus áreas de distribución geográfica, como se puede observar en la Figura 4, *P. ernesti* se distribuye únicamente en la cima del Volcán Sumaco a una altitud de 3900 msnm y se señala que la especie está restringida a este hábitat aislado de gran altitud. *P. devillei* se distribuye en las laderas orientales de los Andes en Ecuador y Perú, en altitudes que oscilan entre 1000 y 3155 msnm. *P. buckleyi* se distribuye en Carchi y Sucumbios con un rango altitudinal entre 2400 y 3700 msnm. *P. curtipes* se distribuye en las cimas de las cordilleras oriental y occidental al sur del desierto de Palmira con un rango altitudinal entre 2750 y 4400 msnm. Por último *P. vertebralis* se distribuye en los bosques nublados andinos en las Provincias de Cotopaxi, Bolívar, Imbabura y Pichincha con un rango altitudinal entre 1800 y 3000 msnm.

Finalmente, podemos decir que *P. ernesti* y *P. devillei* tienen características físicas, hábitats, áreas de distribución geográfica diferentes y ahora gracias a nuestro estudio filogenético, podemos decir que también tienen identidad genética diferente. También podemos decir que *P. ernesti* se relaciona cercanamente con *P. buckleyi, P. curtipes* y *P. vertebralis* a pesar de tener características físicas, hábitats y áreas de distribución geográfica diferentes, genéticamente podría *P. ernesti* ser hermano de una de estas especies.

4.3 Conservación

La validación de la especie *Pristimantis ernesti* en el Parque Nacional Sumaco Napo-Galeras, tiene implicaciones significativas para la conservación de esta área protegida. Ayuda a destacar la importancia de proteger y conservar el parque, debido a que posee biodiversidad

única, como *P. ernesti* y también *Osornophryne sumacoensis* (Gluesenkamp, 1995), por lo que posiblemente existan más especies únicas por descubrir. A demás, conocer que la distribución de *P. ernesti* es limitada al Volcán Sumaco, contribuye a que se genere un mayor interés por preservar esta área protegida, proponiendo estrategias de conservación más efectivas para proteger esta especie endémica del lugar. Por otro lado, también puede haber implicaciones para la investigación científica, dado que ofrece la oportunidad de estudiar y comprender de mejor manera la ecología, la evolución y el comportamiento de *P. ernesti*, y esto podría llevar a la implementación de nuevas medidas de conservación o la modificación de las actuales para proteger la especie y su hábitat. Finalmente, la identificación genética de esta especie puede ser utilizada como un ejemplo para aumentar la conciencia y la educación sobre la importancia de la conservación y la protección de la biodiversidad en el área protegida y en general (Ocampo et al., 2022; Sánchez et al., 2022).

CAPÍTULO V

5 CONCLUSIONES

En este estudio se logró obtener secuencias genéticas de los genes 12s y 16s de *Pristimantis ernesti* y otras especies cercanas de *Pristimantis*. Gracias a la obtención de las secuencias genéticas se consiguió generar alineamientos de los genes 12s y 16s para *Pristimantis* debido a la obtención de sus secuencias genéticas. Y se obtuvieron dos árboles filogenéticos de los genes 12s y 16s mediante los alineamientos realizados, donde según el árbol del gen 12s (Figura 2) y el árbol del gen 16s (Figura 3), *P. ernesti* es un grupo monofilético y con altos soportes de bootstrap, debido a esto se puede decir que es una especie valida y endémica del Parque

Nacional Sumaco Napo-Galeras. Finalmente se sugiere que los grupos más cercanos a *P. ernesti* son *P. buckleyi, P. curtipes* y *P. vertebralis*, aunque más estudios se necesitan para saber con certeza cuál es el grupo más cercano. Se sugiere generar mayor número de investigaciones en *Pristimenatis* y en el Parque Nacional Sumaco Napo-Galeras para entender mejor las estrategias de conservación.

6 RECOMENDACIONES

Según las Figuras 2 y 3, *P. ernesti* está altamente emparentada con *P. buckleyi*, *P. curtipes* y *P. vertebralis*, por lo que no está muy claro cuál es el grupo más cercano a *P. ernesti*. Esto nos dice que los fragmentos del gen 12s y 16s no son necesariamente los más apropiados para resolver las relaciones por sí solos. Por ello se recomienda unir los dos alineamientos de 12s y 16s, para hacer una filogenia en conjunto, además de secuenciar un fragmento adicional y así generar mayor información para resolver con mejor soporte estadístico las relaciones entre estos grupos.

Para profundizar la comprensión de los mecanismos de divergencia de estas especies; se necesita considerar los nuevos hallazgos en la investigación sistemática; es decir, estudios en morfología, genética, ecología y bioacústica. Igualmente, es importante llevar a cabo investigaciones con fragmentos multigénicos de genes nucleares. De este modo se formará una comprensión más completa al construir relaciones filogenéticas basadas en datos moleculares y en taxonomía integrativa (Dayrat, 2005).

Para ayudar a conservar esta especie se recomienda, establecer programas de monitoreo y seguimiento de su población, proteger su hábitat, identificar y controlar especies invasoras o

predadores. Además, identificar patógenos que puedan afectar su población, promover la educación y conciencia sobre la importancia de esta especie y su papel en el ecosistema, tanto entre la población local como entre los visitantes. Finalmente fomentar la sostenibilidad en el parque, tanto en el manejo de los recursos naturales como en la actividad turística, para garantizar la conservación de *P. ernesti* y su hábitat.

7 BIBLIOGRAFÍA

Chen, J. M., Zhou, W. W., Poyarkov Jr, N. A., Stuart, B. L., Brown, R. M., Lathrop, A., Wang, W. W., Yuan, Z. Y., Jiang, K., Hou, M., Chen, H. M., Suwannapoom, C., Nguyen, S. N., Duong, T. V., Papenfuss, T. J., Murphy, R. W., Zhang, Y. P. & Che, J. (2017). A novel multilocus phylogenetic estimation reveals unrecognized diversity in Asian horned toads, genus Megophrys sensu lato (Anura: Megophryidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 106, 28-43.

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods, 9 (8), 772.

Dayrat, B. (2005). Towards integrative taxonomy. *Biological journal of the Linnean society*, 85(3), 407-417.

Flores, G. (1987). A new Eleutherodactylus from Volcan Sumaco, Ecuador. Herpetologica, 90-95.

GBIF.org. (2024). Pristimantis buckleyi. GBIF Occurrence Download https://doi.org/10.15468/dl.vb5x6e

GBIF.org. (2024). Pristimantis curtipes. GBIF Occurrence Download https://doi.org/10.15468/dl.8gcxdf

GBIF.org. (2024). Pristimantis devillei. GBIF Occurrence Download https://doi.org/10.15468/dl.9v6vzp

GBIF.org. (2024). Pristimantis ernesti. GBIF Occurrence Download https://doi.org/10.15468/dl.qfpghc

GBIF.org. (2024). Pristimantis vertebralis. GBIF Occurrence Download https://doi.org/10.15468/dl.6jcs9u

Gluesenkamp, A. G. (1995). A new species of Osornophryne (Anura: Bufonidae) from Volcán Sumaco, Ecuador with notes on other members of the genus. *Herpetologica*, 268-279.

Gonzalez-Duran, G. A., Targino, M., Rada, M., & Grant, T. (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(1), 42-74.

Kai, W., Jinlong, R., Hongman, C., Zhitong, L., Xianguang, G., Ke, J., Jinmin, C., Jiatang, L., Peng, G., Yingyong, W. & Jing, C. (2020). The updated checklists of amphibians and reptiles of China. *Biodiversity Science*, 28(2), 189.

Lynch, J. D. (1969). Identity of two Andean Eleutherodactylus with the description of a new species (Amphibia: Leptodactylidae). *Journal of Herpetology*, 135-143.

Lynch, J. D. (1979). The identity of Eleutherodactylus vertebralis (Boulenger) with the description of a new species from Colombia and Ecuador (Amphibia: Leptodactylidae). *Journal of Herpetology*, 411-418.

Lynch, J. D. (1981). Leptodactylid frogs of the genus Eleutherodactylus in the Andes of northern Ecuador and adjacent Colombia.

Maddison, W. P. & Maddison, D.R. (2023). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.81 http://www.mesquiteproject.org

Madeira, F., Pearce, M., Tivey, A. R., Basutkar, P., Lee, J., Edbali, O., ... & Lopez, R. (2022). Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic acids research*, *50*(W1), W276-W279.

MAE. (2015). Parque Nacional Sumaco. Sistema Nacional de Áreas Protegidas del Ecuador. http://areasprotegidas.ambiente.gob.ec/es/areas-protegidas/parque-nacional-sumaco-napo-galeras

Marchese, C. (2015). Biodiversity hotspots: A shortcut for a more complicated concept. *Global Ecology and Conservation*, 3, 297-309.

Mestanza, C., Henkanaththegedara, S., Vásconez, P., Vargas Tierras, Y. B., Sánchez, M., Constante, D., Jimenez, M., Charco, M. & Mestanza, P. (2020). In-Situ and Ex-Situ Biodiversity Conservation in Ecuador: A Review of Policies, Actions and Challenges. *Diversity*, 12(8), 315.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). (1988). National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information. Recuperado el 8 de noviembre del 2023 de: https://www.nih.gov/

Ocampo, E. P., Marín, S. D., & Correa, M. R. (2022). Genética, bioacústica y morfología revelan una nueva especie oculta en Pristimantis dorsopictus (Anura: Strabomantidae). *Revista Latinoamericana de Herpetología*, 5(1), 60-90.

Ortega-Andrade, H. M., Rodes Blanco, M., Cisneros-Heredia, D. F., Guerra Arévalo, N., López de Vargas-Machuca, K. G., Sánchez-Nivicela, J. C., Armijos-Ojeda, D., Cáceres Andrade, J. F., Reyes-Puig, C., Quezada Riera, A. B., Székely, P., Rojas Soto, O. R., Székely, D., Guayasamin, J. M., Siavichay Pesántez, F. R., Amador, L., Betancourt, R., Ramírez-Jaramillo, S. M., Timbe-Borja, B., ... & Yánez Muñoz, M. H. (2021). Red List assessment of amphibian species of Ecuador: A multidimensional approach for their conservation. *PloS one*, 16(5), e0251027.

Pérez, J. F. G., Chunab, I. N. L., Barrera, L. A. M., Rivera, B. A. P., & Váldes, M. M. Á. (2024). ¿ Sabes qué significan©, TM,® y SM, en propiedad intelectual?. *Revista Digital Universitaria*, 25(1).

Pichardo, F. (2022). *Pristimantis kayi*. [Fotografía]. Recuperado el 2 de febrero de 2024 de: https://bioweb.bio/galeria/Foto/Pristimantis%20kayi/Registros%20fotogr%C3%A1ficos/778411

Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE). (2024). Base de datos de la colección de anfibios del Museo de Zoología QCAZ. Versión 2021.0. Recuperado el 11 de enero del 2024 de: https://bioweb.puce.edu.ec/QCAZ/baseDatos

QGIS.org. (2024). QGIS Geographic Information System. QGIS Association. http://www.qgis.org

Quirola, D. (2022). *Pristimantis buckleyi*. [Fotografía]. Recuperado el 2 de febrero de 2024 de: https://bioweb.bio/galeria/Foto/Pristimantis%20buckleyi/Registros%20fotogr%C3%A1ficos/443549

Reyes-Puig, C., & Mancero, E. (2022). Beyond the species name: an analysis of publication trends and biases in taxonomic descriptions of rainfrogs (Amphibia, Strabomantidae, Pristimantis). *ZooKeys*, *1134*, 73.

Ron, S. R. (2022). *Pristimantis curtipes*. [Fotografía]. Recuperado el 2 de febrero de 2024 de: https://bioweb.bio/galeria/Foto/Pristimantis%20curtipes/Registros%20fotogr%C3%A1ficos/2581

Ron, S. R. (2022). *Pristimantis devillei*. [Fotografía]. Recuperado el 2 de febrero de 2024 de: https://bioweb.bio/galeria/Foto/Pristimantis%20devillei/Registros%20fotogr%C3%A1ficos/239664

Ron, S. R. (2022). *Pristimantis vertebralis*. [Fotografía]. Recuperado el 2 de febrero de 2024 de: https://bioweb.bio/galeria/Foto/Pristimantis%20vertebralis/Registros%20fotogr%C3%A1ficos/245462

Ron, S. R., Merino-Viteri, A. & Ortiz, D. A. (2022a). Lista de especies. *Anfibios del Ecuador. Version 2022.0.* Recuperado el 12 de octubre del 2022, de Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador: https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/EspeciesEstadisticas.

Ron, S. R., Merino-Viteri, A. & Ortiz, D. A. (2022b). Diversidad y Biogeografía. *Anfibios del Ecuador. Version 2022.0.* Recuperado el 19 de enero del 2024, de Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador: https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/DiversidadBiogeografia

Sánchez-Nivicela, J. C., Toral-Contreras, E., & Urgiles, V. L. (2022). Una nueva especie de Pristimantis (Anura: Strabomantidae) de la provincia del Azuay, Andes sur de Ecuador. *Neotropical Biodiversity*, 8(1), 305-322.

Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics, 30(9), 1312-1313.

Sublime HQ Pty Ltd. (2023). Sublime Text (Versión 4.411). [Software de edición de texto]. Sublime HQ Pty Ltd. https://www.sublimetext.com/

Székely, P., Eguiguren, J. S., Ordóñez-Delgado, L., Armijos-Ojeda, D., & Székely, D. (2020). Fifty years after: A taxonomic revision of the amphibian species from the Ecuadorian biodiversity hotspot Abra de Zamora, with description of two new Pristimantis species. *PloS one*, 15(9), e0238306.

UICN. (2024). Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN. Versión 2023-1. Recuperado el 8 de feb. de 24 de: https://www.iucnredlist.org/es/search/stats

West, J. (2018). Importance of amphibians: A synthesis of their environmental functions, benefits to humans, and need for conservation.

8 ANEXOS

Anexo 1

Distancias genéticas del árbol filogenético del gen 12s

	P_curtipes_MK829652.1	P_curtipes_MK829653.1	P_curtipes_I1731	P_vertebralis_I16823	P_vertebralis_EF493689.	P_devillei_I12313	P_devillei_I12318	P_buckleyi_I16626	P_devillei_AY964074.1	P_devillei_EF493688.1	P_devillei_I12485	P_devillei_I13139	P_buckleyi_I15982	P_buckleyi_EF493350.1	P_buckleyi_I13781	P_buckleyi_I13799	P_ernesti_M6598	P_ernesti_M6599	P_ernesti_M6600	P_ernesti_M6798	P_ernesti_M6814 12S
P_curtipes_MK829652.																					
P_curtipes_MK829653.	-0.000																				
P_curtipes_I1731	0.054	0.054																			
P_vertebralis_I16823	0.056	0.056	0.053																		
P_vertebralis_EF493689.1	0.076	0.076	0.049	0.071																	
P_devillei_I12313	0.049	0.049	0.035	0.042	0.066																
P_devillei_I12318	0.049	0.049	0.035	0.042	0.066	-0.000															
P_buckleyi_I16626	0.066	0.066	0.020	0.063	0.061	0.042	0.042														
P_devillei_AY964074.1	0.090	0.090	0.082	0.094	0.082	0.094	0.094	0.097													
P_devillei_EF493688.1	0.068	0.068	0.053	0.059	0.071	0.061	0.061	0.066	0.028												
P_devillei_I12485	0.068	0.068	0.053	0.059	0.071	0.061	0.061	0.066	0.028	-0.000											
P_devillei_I13139	0.071	0.071	0.061	0.061	0.078	0.069	0.069	0.068	0.038	0.007	0.007										
P_buckleyi_I15982	0.056	0.056	0.023	0.056	0.056	0.039	0.039	0.025	0.093	0.066	0.066	0.073									
P_buckleyi_EF493350.1	0.063	0.063	0.023	0.068	0.056	0.044	0.044	0.030	0.083	0.063	0.063	0.071	0.027								
P_buckleyi_I13781	0.063	0.063	0.023	0.068	0.056	0.044	0.044	0.030	0.083	0.063	0.063	0.071	0.027	-0.000							
P_buckleyi_I13799	0.063	0.063	0.023	0.068	0.056	0.044	0.044	0.030	0.083	0.063	0.063	0.071	0.027	-0.000	-0.000						
P_ernesti_M6598	0.052	0.052	0.017	0.062	0.059	0.036	0.036	0.029	0.082	0.067	0.067	0.075	0.026	0.026	0.026	0.026					
P_ernesti_M6599	0.056	0.056	0.016	0.061	0.056	0.037	0.037	0.027	0.082	0.066	0.066	0.073	0.025	0.025	0.025	0.025	0.007				
P_ernesti_M6600	0.056	0.056	0.016	0.061	0.056	0.037	0.037	0.027	0.082	0.066	0.066	0.073	0.025	0.025	0.025	0.025	0.007	-0.000			
P_ernesti_M6798	0.051	0.051	0.011	0.056	0.051	0.032	0.032	0.023	0.082	0.061	0.061	0.068	0.020	0.020	0.020	0.020	0.005	0.004	0.004		
P_ernesti_M6814	0.051	0.051	0.011	0.056	0.051	0.032	0.032	0.023	0.082	0.061	0.061	0.068	0.020	0.020	0.020	0.020	0.005	0.004	0.004	-0.000	

Anexo 2

Distancias genéticas del árbol filogenético del gen 16s

	P_devillei_EF493688_1	P_devillei_I12485	P_devillei_I13139	P_vertebralis_EF493689_1	P_sp_EU186700_1	P_surdus_EF493687_1	P_truebae_MW567362_1	P_sp_EU186661_1	P_curtipes_I1731	P_ernesti_M6598	P_ernesti_M6814	P_ernesti_M6600	P_ernesti_M6798	P_devillei_I12313	P_devillei_I12318	P_buckleyi_I16626	P_buckleyi_I15982	P_buckleyi_I13652	P_buckleyi_I13781	P_buckleyi_EF493350_1	P_buckleyi_I13799
P_devillei_EF493688_1																					
P_devillei_I12485	0,000																				
P_devillei_I13139	0,000	0,000																			
P_vertebralis_EF493689_1	0,078	0,082	0,078																		
P_sp_EU186700_1	0,052	0,050	0,048	0,090																	
P_surdus_EF493687_1	0,049	0,047	0,048	0,077	0,060																
P_truebae_MW567362_1	0,053	0,054	0,053	0,073	0,051	0,039															
P_sp_EU186661_1	0,053	0,054	0,053	0,073	0,051	0,039	0,000														
P_curtipes_I1731	0,051	0,052	0,051	0,084	0,071	0,054	0,054	0,054													
P_ernesti_M6598	0,051	0,045	0,051	0,079	0,066	0,054	0,061	0,061	0,043												
P_ernesti_M6814	0,042	0,044	0,043	0,073	0,052	0,049	0,051	0,051	0,040	0,013											
P_ernesti_M6600	0,051	0,042	0,051	0,080	0,064	0,054	0,057	0,057	0,033	0,011	0,011										
P_ernesti_M6798	0,040	0,041	0,040	0,070	0,055	0,045	0,052	0,052	0,036	0,011	0,005	0,008									
P_devillei_I12313	0,059	0,060	0,058	0,092	0,061	0,063	0,047	0,047	0,068	0,069	0,057	0,064	0,055								
P_devillei_I12318	0,063	0,063	0,062	0,096	0,066	0,070	0,052	0,052	0,070	0,073	0,062	0,070	0,061	0,005							
P_buckleyi_I16626	0,051	0,052	0,052	0,069	0,063	0,050	0,040	0,040	0,053	0,037	0,037	0,033	0,036	0,068	0,070						
P_buckleyi_I15982	0,039	0,042	0,040	0,067	0,047	0,047	0,042	0,042	0,045	0,046	0,037	0,047	0,036	0,039	0,045	0,037					
P_buckleyi_I13652	0,049	0,050	0,048	0,073	0,052	0,060	0,056	0,056	0,045	0,040	0,029	0,039	0,028	0,061	0,066	0,041	0,031				
P_buckleyi_I13781	0,054	0,054	0,053	0,076	0,056	0,062	0,060	0,060	0,045	0,041	0,034	0,040	0,031	0,066	0,069	0,044	0,036	0,005			
P_buckleyi_EF493350_1	0,050	0,051	0,049	0,074	0,053	0,061	0,057	0,057	0,045	0,041	0,030	0,040	0,030	0,062	0,068	0,041	0,032	0,001	0,006		
P_buckleyi_I13799	0,046	0,047	0,045	0,071	0,051	0,054	0,051	0,051	0,045	0,033	0,028	0,030	0,028	0,058	0,061	0,041	0,028	0,000	0,005	0,001	