



Een nieuwe soort Andes-gifkikker, *Andinobates* (Anura: Dendrobatidae), uit de noordwestelijke Andes van Colombia

ADOLFO AMÉZQUITA^{1,5}, ROBERTO MÁRQUEZ¹, RICARDO MEDINA², DANIEL MEJÍA-VARGAS¹, TED R. KAHN³, GUSTAVO SUÁREZ⁴ & LUIS MAZARIEGOS⁴

¹Departement Biologische Wetenschappen, Universidad de los Andes, AA 4976. Bogotá, Colombia. E-mails: aamezqui@uniandes.edu.co, r.marquez96@uniandes.edu.co, pyrrhura@gmail.com

²Departement Biologie, Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia. E-mail: ramedinar@ut.edu.co

³Neotropical Conservation Foundation. Washington, DC, VS. E-mail: tedr.kahn@gmail.com

⁴THC Foundation, Calle 17A nr. 121-11. Cali, Colombia. E-mail: lamh@thc-fc.org

⁵Overeenkomende auteur

Abstract

De gifkikkers van de Colombiaanse Andes, de Pacifische laaglanden en Panama zijn onlangs erkend als een nieuw, monofyletisch en goed ondersteund geslacht: *Andinobates*. De soortenrijkdom en verspreiding binnen *Andinobates* blijven slecht begrepen vanwege het gebrek aan geografische, genetische en fenotypische gegevens. Hier gebruiken we een combinatie van moleculair, bio-akoestisch en morfometrisch bewijs om een nieuwe soort Andes-gifkikker te beschrijven: *Andinobates cassidyhornae* sp. nov. van de hooggelegen nevelwouden van de Colombiaanse Cordillera Occidental, in de noordwestelijke Andes. De nieuwe soort wordt geassocieerd met de *bombetes*-groep en wordt gekenmerkt door een unieke combinatie van ventrale en dorsale kleurpatronen.

Gegevens over 1119 bp van twee mitochondriale markers stelden ons in staat om de nulhypothese dat *A. cassidyhornae* sp. nov. maakt deel uit van de fenotypisch vergelijkbare en geografisch minder afgelegen soorten: *A. opisthomelas*, *A. virolinensis* of *A. bombetes*. De best beschikbare fylogenetische bomen en de genetische afstand tot andere *Andinobates*-soorten ondersteunen deze beslissing verder. Al met al scheiden de parameters van de advertentieaanroep *A. cassidyhornae* sp. nov. oproepen van de oproepen van de drie meest nabijgelegen soorten. De nieuwe soort draagt bij aan een slecht bekend en zeer bedreigd geslacht van gifkikkers dat verdere studies en dringende instandhoudingsmaatregelen vereist.

Trefwoorden: *Andinobates cassidyhornae* sp. nov., dendrobatide kikkers, gifkikkers, fylogenetica, distributie, instandhouding, Colombia, Andes

Overzicht

De kleine gifkikkers van de Colombiaanse Andes en de Stille Oceaan en Panama zijn onlangs erkend als een nieuw, monofyletisch en goed ondersteund geslacht: de Andesgifkikkers of *Andinobates*. De rijkdom aan soorten en hun verspreiding zijn weinig bekend, voornamelijk vanwege de schaarste aan geografische, genetische en fenotypische gegevens. We gebruiken een combinatie van moleculair, bio-akoestisch en morfometrisch bewijs om een nieuwe soort Andes-gifkikker, *Andinobates cassidyhornae* sp. nov., uit nevelwouden in de noordwestelijke Andes van Colombia. De nieuwe soort maakt deel uit van de *bombetes*-groep en wordt gekenmerkt door een unieke combinatie van dorsale en ventrale kleuring.

Analyse van 1119 bp van twee mitochondriale markers stelde ons in staat om de nulhypothese dat *A. cassidyhornae* sp. nov. maakte deel uit van de fenotypisch vergelijkbare en geografisch nauw verwante soorten *A. opisthomelas*, *A. virolinensis* of *A. bombetes*. Best beschikbare fylogenetische bomen en genetische afstanden tot andere *Andinobates*-soorten ondersteunen die conclusie ook. Alles bij elkaar genomen scheiden de parameters van de aankondigingsoproepen duidelijk de oproepen van *A. cassidyhornae* sp. nov. van de roep van de drie verwante soorten. Deze nieuwe soort voegt zich bij de anderen van dit geslacht van giftige kikkers, weinig bekend maar zeer bedreigd, die verder onderzoek en dringende instandhoudingsmaatregelen vereisen.

Invoering

Neotropische gifkikkers (Dendrobatidae) zijn een van de meest charismatische en meest bestudeerde kikkertaxa. Het aantal nieuwe soortenbeschrijvingen is sinds 1970 gestaag toegenomen en sinds 1990 dramatisch (Brown & Twomey *et al.* 2011). De meeste recent beschreven soorten zijn minuscule gifkikkers, een monofyletische groep (Grant *et al.* 2006, Santos *et al.* 2009) bestaande uit twee zusterlijnen met vrijwel niet-overlappende verspreidingsgebieden: de soort in de *ventrimaculata*- en *minuta*-groepen, voorheen geplaatst binnen het geslacht *Ranitomeya* (Grant *et al.*

2006). Een recente fylogenetische analyse, gebaseerd op mitochondriale (cytochroom-b-gen, 12S ribosomaal RNA en 16S ribosomaal RNA) en nucleaire markers (rhodopsine exon 1, recombinatie activerend gen 1, histon H3, 28S rDNA en zevende bij verstek) leidde tot de erectie van een nieuw geslacht, *Andinobates*, voor de soort in de voormalige *minuta*-groep (Brown & Twomey *et al.* 2011). Terwijl de soorten van het geslacht *Ranitomeya* (*sensu* Brown & Twomey *et al.* 2011) ten oosten van de Andes en in het hele Amazonebekken voorkomen, komen de *Andinobates*-soorten voor in de Colombiaanse Andes, de Colombiaanse Stille Oceaan en noordwaarts in het laagland Panama.

Soorten in de *A. bombetes*-groep worden in het bijzonder bedreigd door intensieve landbouwactiviteiten binnen het hoogtebereik van 1300-2300 m. De meeste zijn beperkt tot onsamenhangende bosfragmenten omringd door landbouw. De groep omvat momenteel zeven soorten: *Andinobates abditus* (Myers & Daly 1976), *A. bombetes* (Myers & Daly 1980), *A. daleswansonii* (Rueda-Almonacid *et al.* 2006), *A. dorisswansonae* (Rueda-Almonacid *et al.* 2006), *A. opisthomelas* (Boulenger 1899), *A. tolimensis* (Bernal *et al.* 2007) en *A. virolinensis* (Ruiz-Carranza & Ramírez-Pinilla 1992). Velen van hen worden momenteel gediagnosticeerd op basis van kleuring. De huidige trend om moleculaire en bio-akoestische analyses te gebruiken, naast morfologische en meristische gegevens, biedt een cruciaal inzicht in de limieten en relaties van soorten, waardoor een duidelijker beeld ontstaat van de mate van intra- en interspecifieke variatie, wat taxonomisch werk enorm vergemakkelijkt.

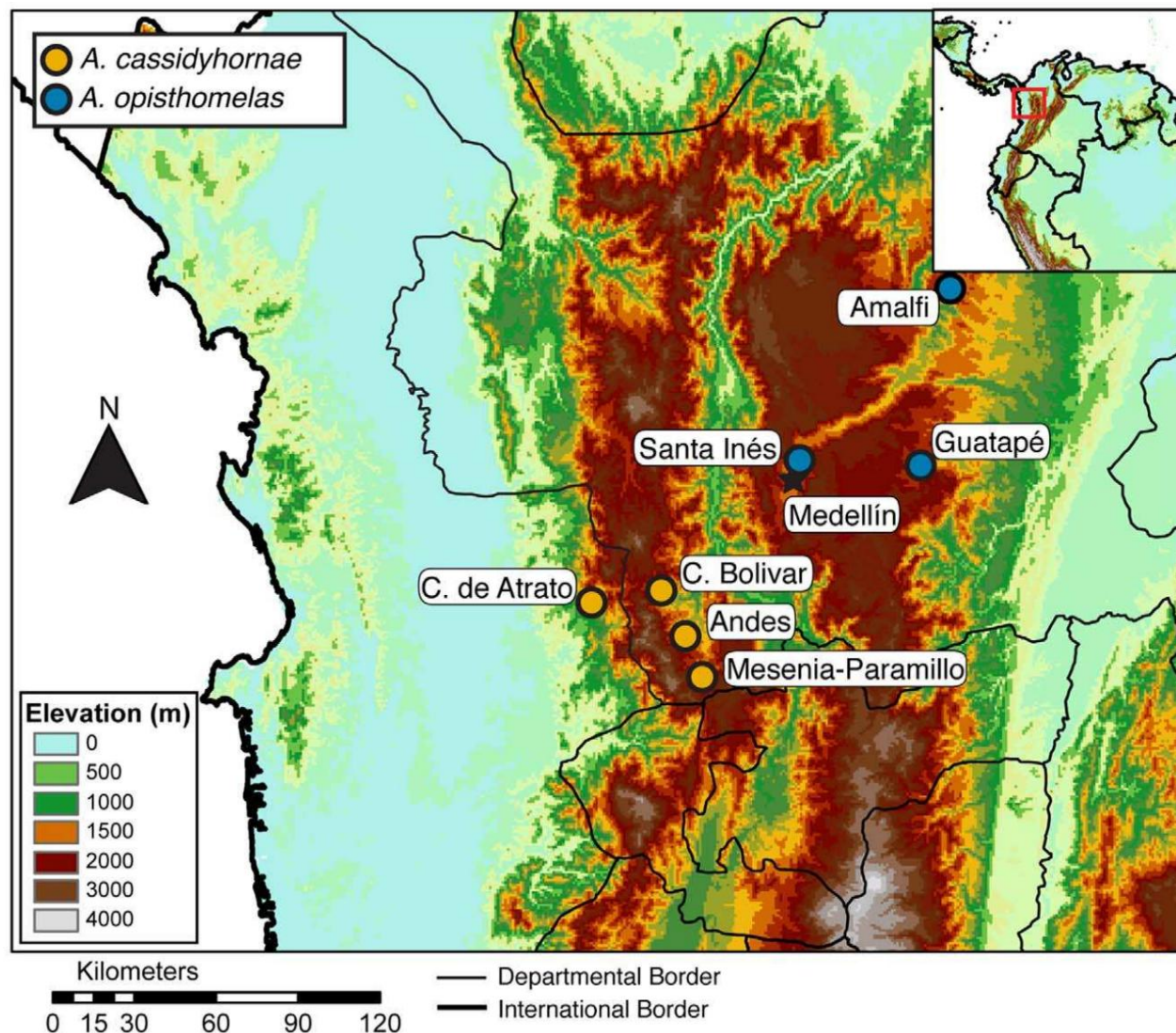
Tijdens verkennend veldwerk in het onlangs gecreëerde natuurreservaat Mesenia-Paramillo, in de Colombiaanse Andes, Cordillera Occidental, werden we ons bewust van een *Andinobates*-populatie die voorlopig werd toegewezen aan *A. opisthomelas* op basis van zijn dorsale kleuring en geografische locatie. Nader nauwkeurig onderzoek van kleur in combinatie met patroon onderscheidde het in onze ogen als potentieel nieuw voor de wetenschap. Latere moleculaire en bio-akoestische analyses van kikkers uit vier plaatsen onthulden een duidelijke afstamming die als een nieuwe soort moet worden beschouwd. Ons doel hier is om het bewijs met meerdere eigenschappen te presenteren dat de status van *Andinobates* **sp. nov.** *cassidyhornae* als een nieuwe soort.

Materiaal en methoden

Monsters werden verzameld op vier plaatsen in de Cordillera Occidental in de noordwestelijke Colombiaanse Andes (Figuur 1). De holotype- en paratype-exemplaren, uit het Mesenia-Paramillo Natural Reserve, Antioquia, werden opgeofferd en bewaard volgens de standaardprocedures voorgesteld door McDiarmid *et al.* (1994). De volgende metingen zijn gedaan volgens Bernal *et al.* (2007), met behulp van een Mitutoyo Absolute CD-6[™]CSX digitale schuifmaat, tot op 0,01 mm nauwkeurig: SVL, lengte snuit-ventilatie; TL, tibialengte gemeten tussen hiel en buitenoppervlak van gebogen knie; GBW, grootste lichaamsbreedte genomen net onder de oksels; HW, kopbreedte tussen hoeken van kaken; IOD, interorbitale afstand; HL, hoofdengte, sagittale afstand van de punt van de snuit tot de kaakhoek; TSCN, punt van snuit tot midden van neusgat; NED, afstand van het midden van de neusgaten tot de voorste oogrand; IND, afstand tussen centra van neusgaten; EL, oogengte; HDT, horizontale diameter van timpaan; MTD, afstand van mondhoek tot onderrand van trommelvlies; HaL, handengte gemeten vanaf de proximale rand van de grote mediale palmale tuberkel tot de top van de langste derde vinger; W3FD, breedte van derde vingerschijf; W3F, breedte van derde vinger onder schijf; W3TD, breedte van de derde teenschijf; W3T, breedte van derde teen onder schijf; W4TD, breedte van de vierde teenschijf; en W4T, breedte van de vierde teen onder de schijf. De lichaamsmassa werd gemeten met een DigiWeigh DW-100AS digitale weegschaal, tot op 0,01 g nauwkeurig.

Moleculaire en fylogenetische analyses. Weefselmonsters voor moleculaire analyses werden verkregen uit monduitstrijkjes of teenknipsels van negen individuen van *A. cassidyhornae* **sp. nov.**, van vier plaatsen, en drie individuen van *A. opisthomelas* uit Amalfi (lat. 6.88, lang. -75.09) en Guatapé (lat. 6.27, lang. -75.19), Antioquia (Figuur 1). Teenknipsels werden bewaard in 96% ethanol en swabs werden droog bewaard. Genomisch DNA werd geëxtraheerd met behulp van QIAGEN DNeasy Blood and Tissue-kits. Monsters en extracties werden bewaard bij -20°C. We amplificeerden fragmenten van twee mitochondriale loci: 16S rRNA (16S; 574bp) en het Cytochrome b-gen (*Cytb*; 700bp) met behulp van primers 16Sar

en 16Sbr (Palumbi *et al.* 1991), en respectievelijk CytbDen3-L en CytbDen1-H (Santos & Cannatella 2011). PCR-cycli voor beide loci bestonden uit een eerste 2 min bij 95 ° C en 30-35 cycli van 30 sec bij 95 ° C, 1 min bij 45 ° C, 1:30 min bij 72 ° C en een laatste verlengingsstap van 6 min bij 72 ° C. *Cytb*-sequenties werden ook verkregen voor kikkers van verschillende *Andinobates*-soorten waarvan de sequentie was bepaald voor het 16S-gen in een eerdere studie (Brown & Twomey *et al.* 2011) met behulp van het hierboven genoemde protocol. Alle sequenties zijn gedeponerd in GenBank onder toegangsnummers JQ936619 – JQ936638 en JX879706 – JX879725.



FIGUUR 1. Bemonsterde plaatsen (in geel, lat, lang in graden, hoogte in m) van *A. cassidyhornae* sp. nov. in de noordwestelijke Colombiaanse Andes: Mesenia-Paramillo (5,52, -75,89, 2059 m), Andes (5,69, -75,92, 1367 m), Ciudad Bolivar (5,85, -76,04, 1260 m) en Carmen de Atrato (5,83, -76,26, 1248 m). Als referentie voegen we drie plaatsen van *A. opisthomelas* toe: Santa Inés komt overeen met de nu uitgestorven populatie van de typeplaats van *A. opisthomelas*, die niet werd bemonsterd, Amalfi komt overeen met de witte buikvorm en Guatapé met de bruine buikvorm.

De verkregen homologe sequenties, evenals sequenties die beschikbaar zijn in GenBank voor *Ranitomeya fantastica*, gebruikt als outgroup, en de meeste soorten *Andinobates* (Tabel 1), werden uitgelijnd met behulp van MUSCLE (Edgar 2004), geïmplementeerd in Geneious (Drummond *et al.* 2010); de resulterende uitlijningen werden visueel gecorrigeerd om spleetplaatsingen op te lossen. De uiteinden van uitlijningen die informatie bevatten voor minder dan 75% van de sequenties werden bijgesneden en uitgesloten van daaropvolgende analyses.

TABEL 1. Plaatsen en GenBank-toetredingsnummers van de monsters die zijn gebruikt in moleculaire analyses.

Soorten	Plaats	Studie	GenBank-toetreding	
			16S	Cytb
<i>A. gloeilampen</i>	Colombia, Quindío, Barbas, Hacienda Lusitanië	Santos <i>et al.</i> 2009	EU342669	JN 635880
<i>A. gloeilampen</i>	Colombia, Quindío, Barbas, Hacienda Lusitanië	Santos & Cannatella, 2011	HQ290981	HQ290558
<i>A. cassidyhornae</i> sp. nov.	Colombia, Antioquia, Mesenië Natuurreservaat Paramillo	Deze studie	JQ936636	JQ936622
<i>A. cassidyhornae</i> sp. nov.	Colombia, Antioquia, Mesenië Natuurreservaat Paramillo	Deze studie	JQ936637	JQ936623
<i>A. cassidyhornae</i> sp. nov.	Colombia, Antioquia, Mesenië Natuurreservaat Paramillo	Deze studie	JQ936638	JQ936624
<i>A. cassidyhornae</i> sp. nov.	Colombia, Antioquia, Andes	Deze studie	JX879709	JX879719
<i>A. cassidyhornae</i> sp. nov.	Colombia, Antioquia, Bolivar Stad	Deze studie	JX879710	JX879720
<i>A. cassidyhornae</i> sp. nov.	Colombia, Antioquia, Bolivar Stad	Deze studie	JX879714	JX879724
<i>A. cassidyhornae</i> sp. nov.	Colombia, Antioquia, Bolivar Stad	Deze studie	JX879715	JX879725
<i>A. cassidyhornae</i> sp. nov.	Colombia, Chocó, Carmen de Atrato	Deze studie	JX879711	JX879721
<i>A. cassidyhornae</i> sp. nov.	Colombia, Chocó, Carmen de Atrato	Deze studie	JX879712	JX879722
<i>A. cassidyhornae</i> sp. nov.	Colombia, Chocó, Carmen de Atrato	Deze studie	JX879713	JX879723
<i>A. Claudia</i>	Panama. Bull's monden	Roberts <i>et al.</i> 2006	DQ371315	DQ371334
<i>A. dorisswansonae</i>	Colombia, Tolima, Falan	Bruin <i>et al.</i> 2011	JN635861	JQ936629
<i>A. dorisswansonae</i>	Colombia, Tolima, Falan	Bruin <i>et al.</i> 2011	JN635863	JQ936630
<i>A. bliksem</i>	Colombia, Choco, Bahia Solano, Sierra Mecana	Grant <i>et al.</i> 2006	DQ502106	DQ502538
<i>A. opisthomelas</i>	Colombia, Antiochië, Guatemala	Deze studie	JQ936633	JQ936619
<i>A. opisthomelas</i>	Colombia, Antiochië, Guatemala	Deze studie	JQ936634	JQ936620
<i>A. opisthomelas</i>	Colombia, Antiochië, Guatemala	Deze studie	JQ936635	JQ936621
<i>A. opisthomelas</i>	Colombia, Antioquia, Amalfi	Deze studie	JX879706	JX879716
<i>A. opisthomelas</i>	Colombia, Antioquia, Amalfi	Deze studie	JX879707	JX879717
<i>A. opisthomelas</i>	Colombia, Antioquia, Amalfi	Deze studie	JX879708	JX879718
<i>A. min</i>	Panama, Cocle, El Cope, Park Nationaal generaal-majoor Omar Torrijos Herrera	Grant <i>et al.</i> 2006	DQ502168	DQ502603
<i>A. sp. Quibdo</i>	Colombia, Choco, Quibdo, La Troje	Santos <i>et al.</i> 2009	EU342670	JN635881
<i>A. tolimensis</i>	Colombia, Tolima, Falan	Bruin <i>et al.</i> 2011	JN635857	JQ936632
<i>A. tolimensis</i>	Colombia, Tolima, Falan	Bruin <i>et al.</i> 2011	JN635857	JQ936631
<i>A. virolinensis</i>	Colombia, Santander, Virolín, Rib van Fara	Bruin <i>et al.</i> 2011	JN635873	JQ936626
<i>A. virolinensis</i>	Colombia, Santander, Virolín, Rib van Fara	Bruin <i>et al.</i> 2011	JN635871	JQ936627
<i>A. virolinensis</i>	Colombia, Santander, Socorro	Bruin <i>et al.</i> 2011	JN635875	JQ936625
<i>A. virolinensis</i>	Colombia Santander Socorro	Bruin <i>et al.</i> 2011	JN635876	JQ936628
<i>A. virolinensis</i>	Colombia, Santander, Virolín, Rib van Fara	Santos & Cannatella, 2011	HQ290994	HQ290571

Om de fylogenetische relaties tussen de vermeende nieuwe soort en andere *Andinobates te schatten*, hebben we gepartitioneerde maximale waarschijnlijkheid (ML; Felsenstein 1981) en Bayesian (Rannala & Yang 1996) uitgevoerd.

analyseert. De ML-analyse werd uitgevoerd in RaxML (Stamatakis 2006) onder het GTR+ γ -model en met 1000 bootstrap-replica's om nodale ondersteuning te beoordelen. De Bayesiaanse fylogenie werd afgeleid met behulp van MrBayes (Ronquist & Huelsenbeck 2003) op basis van de beste substitutiemodellen geselecteerd voor elke locus met behulp van het programma PartitionFinder (Lanfear *et al.* 2012). Twee replicaties met vier ketens werden gedurende 10.000.000 generaties uitgevoerd, waarbij elke 1000 monsters werden genomen en de eerste 2500 bomen werden weggegooid als burnin. Ketenconvergentie is onderzocht met Tracer (Rambaut & Drummond 2007). Voor beide analyses werden de twee uitlijningen aaneengeschaald en werd de dataset gepartitioneerd met behulp van het beste partitieschema volgens PartitionFinder (Lanfear *et al.* 2012), dat tegelijkertijd de beste partitioneringsstrategie en het beste evolutionaire model voor elke partitie selecteert. Kimura-twee-parameter (K2P; Kimura 1980) genetische afstanden tussen *Cytb*-sequenties van individuen van de *bombetes*-soortgroep (Brown & Twomey *et al.* 2011) werden geschat met behulp van MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011).

Om te testen of de vermeende nieuwe soort kon worden toegewezen aan andere soorten *Andinobates* op basis van het beste beschikbare genetische bewijs, hebben we Shimodaira-Hasegawa-tests uitgevoerd (SH-tests; Shimodaira & Hasegawa 1999). Kortom, ze testen of een nul-fylogenetische hypothese significant slechter is dan een alternatieve, op basis van herbemonstering en maximale waarschijnlijkheidsverschillen. We hebben de topologie van de beste ML-boom, afgeleid door RAxML (zie vorige paragraaf), getest als de alternatieve hypothese (H_a) tegen elk van drie nul (H_0) hypothesen: *A. cassidylhornae*

sp. nov. het vormen van een enkele (polytomische) clade (de testclade) met (1) *A. opisthomelas*, (2) met *A. virolinensis* en (3) met *A. bombetes*. We hebben voor deze drie soorten gekozen omdat ze deel uitmaken van de *bombetes*-groep, ze komen voor op plaatsen die geografisch dicht bij de *A. cassidylhornae* **sp. nov.** type plaats, en ze hebben allemaal ongeveer dezelfde rode dorsale kleuring (patroon als longitudinale dorsolaterale strepen in *A. bombetes*). SH-tests werden uitgevoerd met het R-pakket Phangorn (R Development Core Team 2011, Schliep 2011), en de waarschijnlijkheid werd geschat onder het GTR+ γ -model met 100.000 bootstrap-replica's. Testtopologieën werden gegenereerd in Mesquite (Madisson & Madisson 2011), en bestonden uit een boom inclusief de testclade, maar verder identiek aan H_a .

Bioakoestische analyses. Mannetjes van *Andinobates*-soorten uiten reclamekreten van het 'buzz'-type (Myers & Daly 1976, Brown & Twomey *et al.* 2011). Elke samentrekking van de rompspier produceert een enkele 'buzz' (dwz oproep) die bestaat uit een lange reeks pulsen met amplitude maar geen frequentiemodulatie (Erdtmann & Amézquita 2009).

We namen spontane reclame-oproepen op van zeven focale mannen (vijf van de typelocatie en twee van Carmen de Atrato) met een Audio-Technica AT897 Shotgun-microfoon en een K-Tek KE-89CC-boompole, aangesloten op een Tascam DR-100 professionele recorder. De luchttemperatuur werd geregistreerd met een RH 101 Extech IR thermo-hygrometer. Digitale opnames op 44 kHz werden geanalyseerd op Raven 1.4 (Cornell Laboratory of Ornithology, NY, VS). Drie opeenvolgende oproepen per man werden gemeten in de volgende temporele en spectrale parameters: aantal pulsen per oproep, oproepduur, intercall-interval (stil interval tussen opeenvolgende oproepen), stijgtijd (percentage van oproepduur tot het punt met de hoogste amplitude), piek frequentie en de frequentiebandbreedte (interkwartielbereik: het frequentiebereik dat de middelste 50% van de energie in de selectie omvat).

Om te testen of de oproepen van de nieuwe soort statistisch konden worden onderscheiden van de oproepen van de fylogenetisch en geografisch meest nabije soorten van de *bombetes*-groep (Brown & Twomey *et al.* 2011), hebben we mannetjes opgenomen van vier extra locaties. Twee ervan vertegenwoordigen de extremen van de bekende variatie in ventrale kleuring van *A. opisthomelas*, het uiterlijke karakter dat het beste toelaat om de nieuwe soort te herkennen. Zes mannetjes werden geregistreerd van de witbuikvorm (zie Definitie en diagnose) in Amalfi en zes mannetjes van de bruinbuikvorm in Guatapé (zie Moleculaire en fylogenetische analyses), beide in Departamento de Antioquia, Colombia. Zeven mannetjes werden bovendien geregistreerd van *A. bombetes* in Reserva Forestal Yotoco (ongeveer 4 km oostwaarts van de typeplaats, Departamento del Valle del Cauca) en zeven mannetjes van *A. virolinensis* in Virolín (de typeplaats, in Departamento de Santander).

Omdat anuran-oproepkenmerken kunnen worden beïnvloed door lichaamstemperatuur, hebben we eerst elk oproepkenmerk tegengesteld aan: omgevingstemperatuur. Waar de regressie statistisch significant was, hebben we de overeenkomstige residuen bewaard en gebruikt als nieuwe temperatuuronafhankelijke variabelen in onze verdere analyses. Om te testen of de oproepen van *A. cassidylhornae* **sp. nov.** verschillen van de oproepen van de drie meest nabije soorten (*A. opisthomelas*, *A. bombetes* en *A. virolinensis*), hebben we een discriminantfunctieanalyse uitgevoerd waarbij alle oproepkenmerken tegelijkertijd werden overwogen. Om het relatieve belang van elk oproepkenmerk bij het scheiden van de soorten te kennen, vergeleken we de overeenkomstige gestandaardiseerde discriminantcoëfficiënten en voerden soorten paarsgewijze Tukey-Kramer HSD-tests uit.

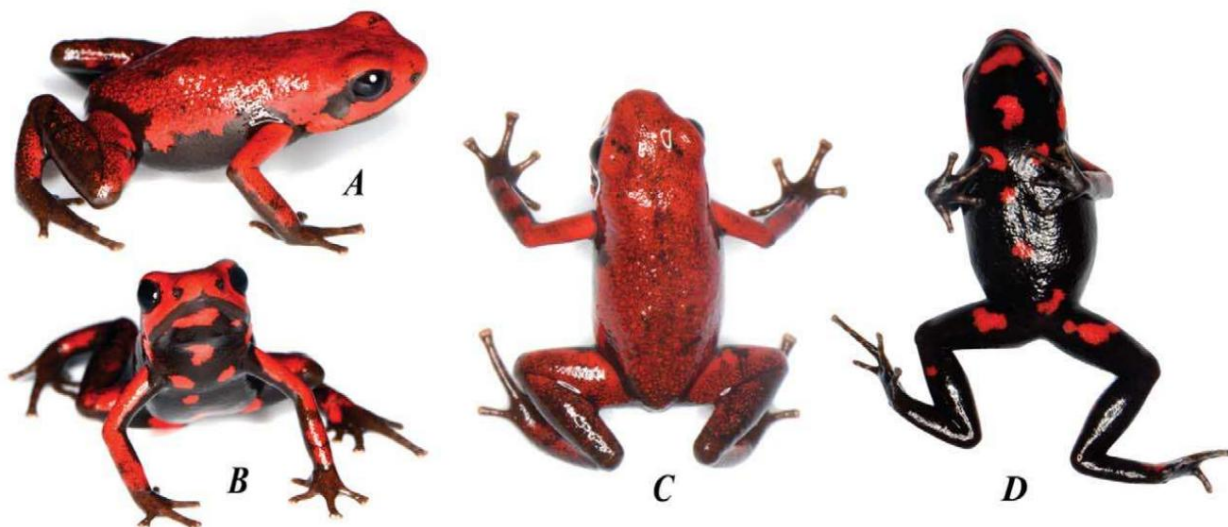
Resultaten

Andinobates cassidyhornae sp. nov.

Dendrobates opisthomelas Silverstone 1975. Quebrada Arriba, bushalte 10 km over de weg van de stad Andes, bergen nabij weg (LACM 71962-70).

Andinobates opisthomelas Brown & Twomey *et al.* 2011. pp 33 Plaat 3, Figuur O. Guatapé Antioquia, Colombia, vanwege een fout in het definitieve manuscript. De juiste plaats volgens een van de auteurs van dat artikel (DM-V.), die de foto daadwerkelijk heeft gemaakt, is Carmen de Atrato, Chocó, Colombia.

Holotype: Een volwassen vrouwtje (Figuur 2) gedeponerd in de amfibieëncollectie van de Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia, Andes-A1095 (Veldnummer LUMA1001) is een van een serie verzameld op 30 maart 2012 in het Mesenia-Paramillo Natuurreservaat, gemeente Andes, departement Antioquia, Colombia, door R. Medina, G. Suárez & L. Mazariegos.



AFBEELDING 2. Het holotype van *A. cassidyhornae* sp. nov. in A) lateraal, B) gedeeltelijk ventraal, C) dorsaal en D) ventraal aanzicht (foto's © 2012 L. Mazariegos).

Paratypes: vier volwassen vrouwtjes en twee volwassen mannetjes (Andes-A1088-1091 en 1093-1095), verzameld door R. Medina, G. Suárez & L. Mazariegos. Vindplaatsgegevens zijn gelijk aan het type plaats (zie hieronder).

Typ plaats. Natuurreservaat Mesenia-Paramillo, Vereda La Mesenia, ongeveer 12 km ten zuiden van de gemeente Jardín, maar politiek gezien binnen de gemeente Andes, (beide in Departamento de Antioquia, Colombia), ca 5° 31' N, 75° 53' W at 2000 m hoogte. Vanwege de zware smokkel op dendrobatide kikkers onthouden we ons van nauwkeurigere coördinaten.

Etymologie. Dit specifieke epitheton *cassidyhornae* is een patroniem ter ere van Cassidy Horn, voor haar passionele interesse in gifkikkers en haar genereuze bijdragen aan het behoud van nevelwouden in Colombia.

Definitie en diagnose. Een kleine dendrobatide kikker die we toewijzen aan de *Andinobates bombetes* soortengroep (Brown & Twomey *et al.* 2011) op basis van de fylogenetische affiniteit (zie *Molecular and Phylogenetic Analyses*) en op de volgende morfologische kenmerken: volwassen snuit-romplengte (SVL) <20,0 mm; volwassenen met heldere dorsale kleuring; ventrale kleurvariabele, meestal met duidelijke heldere markeringen; gekleurde keelvlek afwezig; hoofd smaller dan lichaam; tanden afwezig; stemspletten aanwezig bij mannen; eerste vinger duidelijk korter dan de tweede (Figuur 3); vingerschijven II en III zwak tot matig uitgezet; teenschijf III en IV zwak uitgezet; teen V niet uitgezet; teenband afwezig; mediaan linguaal proces afwezig (Brown & Twomey *et al.* 2011).

Andinobates cassidyhornae sp. nov. heeft een SVL van $19,03 \pm 0,31$ mm (gemiddelde \pm SD, N = 12 kikkers), een helderrood dorsum met de kleur die zich uitstrekt tot aan de bovenste voor- en achterpoten; onderarmen en achterpoten zijn donkerbruin. Ventrale kleuring is zwart met felrode, onregelmatige grootte en uit elkaar geplaatste eivormige of 'komma'-vormige vlekken of vlekken. Het kan extern worden onderscheiden van andere soorten in de *bombetes* -groep door de kenmerkende kleur

patroon: bij *A. cassidyhornae* is dorsum felrood en is de venter zwart met goed gedefinieerde felrode vlekken of vlekken (Figuur 4) vs. (1) bij *A. is opisthomelas* dorsum rood, vaak met een achterste zweem tot bruin, en venter is zwart met talrijke witte vlekken of verknoping (wit-venter vorm) of venter is chocoladebruin, soms met rode zweem van de flanken (bruin-venter vorm); (2) bij *A. virolinensis* is venter witachtig of blauwachtig met zwarte verknoping; (3) bij *A. bombetes* vertoont de voorste helft van het dorsum helderrode, gele of zelden oranje longitudinale en brede dorsolaterale strepen; (4) bij *A. tolimensis* is de kop geel, verkleurend naar bruin naar het dorsum toe; (5) bij *A.*

dorisswansonae het dorsum is zwart of bruin met rode vlekken, en de venter geheel zwart of zwart met enkele witte of geelachtige vlekken; en (6) bij *A. daleswasoni* is de kop geheel rood en het lichaam dof goud of bruin.

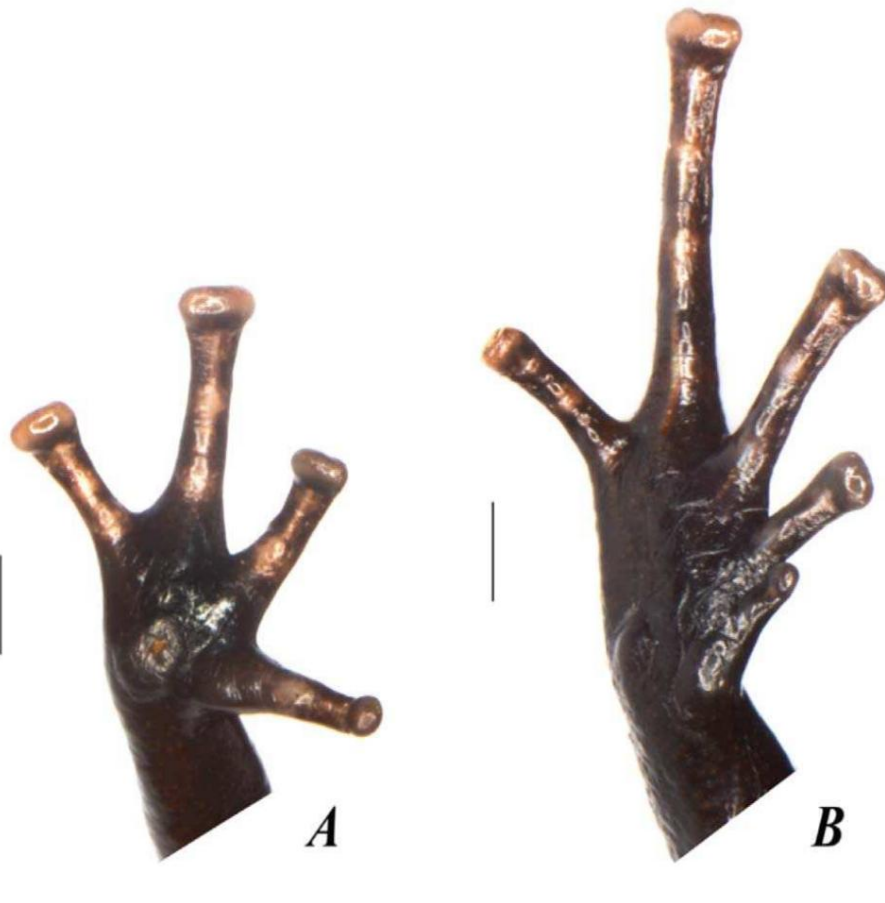
Afmetingen van het holotype (mm). De holotype-metingen komen overeen met een volwassen vrouwtje met een SVL van 18,99 mm; TL van 8,10; HaL van 4,58; HL van 4,85; HW van 6,29; GBW van 7,54; IOD van 2,31; HDT van 1,23; ED van 2,15; TSCN van 1,40; NED van 1,52; IND van 2,36; MTD van 0,75; W3FD van 0,78; W3F van 0,46; W3TD van 0,83; W3T van 0,47; W4TD van 0,87; en W4T van 0,49. De overeenkomstige metingen van alle verzamelde monsters worden weergegeven in Tabel 2.

TABEL 2. Metingen in millimeters voor de typereeks van *Andinobates cassidyhornae*, sp. nov.

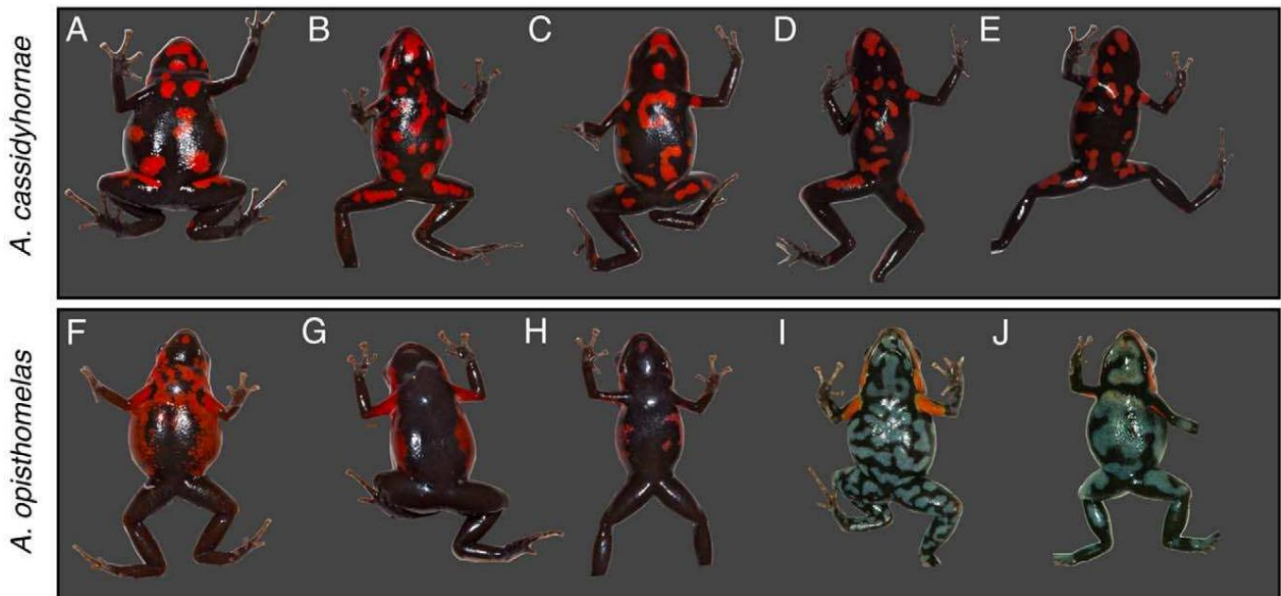
Afmetingen Andes	Andes	Andes	Andes	Andes	Andes	Andes	Andes	Mediaan SD	
A1093	A1088	A1089	A1090	A1094	A1091	A1095			
SVL	19.36	19.34	19.17	18.92	18.45	18.99	18.99	18.99	0.31
TL	8.59	8.52	8.23	8.51	8.50	8.66	8.10	8.51	0.20
Ding	4.59	4.67	4.67	4.60	5.14	4.91	4.58	4.67	0.21
HL	6.06	5.59	5.17	4.75	5.09	5.00	4.85	5.09	0.46
HW	5.38	5.99	5.94	5.75	6.20	5.90	6.29	5.94	0.30
GBW	8.50	8.85	8.13	7.11	7.56	7.20	7.54	7.56	0.66
IOD	2.38	2.30	2.12	1.85	2.26	2.14	2.31	2.26	0.18
HTD	1.41	1.17	0.98	0.96	1.05	0.97	1.23	1.05	0.17
ED	2.49	2.31	2.12	2.45	2.47	2.21	2.15	2.31	0.16
TSCN	1.78	1.34	1.26	1.22	1.54	1.35	1.40	1.35	0.19
OMLAAG	1.71	1.68	1.54	1.57	1.78	1.68	1.52	1.68	0.10
IND	2.47	2.33	2.32	2.42	2.84	2.56	2.36	2.42	0.18
MTD	0.84	0.72	0.67	0.60	0.89	0.91	0.75	0.75	0.12
W3FD	0.94	0.99	0.85	0.95	1.12	1.10	0.78	0.95	0.12
W3F	0.49	0.44	0.48	0.53	0.65	0.52	0.46	0.49	0.07
W4TD	0.98	0.83	0.64	0.71	1.01	0.93	0.87	0.87	0.14
W4T	0.55	0.52	0.43	0.41	0.60	0.56	0.49	0.52	0.07
W3TD	0.69	0.91	0.66	0.79	0.83	0.78	0.83	0.79	0.09
W3T	0.50	0.54	0.54	0.52	0.68	0.57	0.47	0.54	0.07
BM in gram 0,64		0,62	0,58	0,59	0,53	0,58	0,60	0,59	0,03

Beschrijving van het holotype: De kop is iets breder dan langer en smaller dan het lichaam. Snuit subovoid in dorsaal aanzicht en afgeknot in zijaanzicht. *Canthus rostralis* subovoid, loreal gebied vlak en verticaal. De neusgaten bevinden zich veel dicht bij het einde van de snuit dan bij de ogen, eivormig van vorm en posterolateraal gericht. Ogen groot en prominent met een diameter van 11,3% van SVL. De pupil is afgerond en horizontaal elliptisch. Tympana en trommelvlies ringen zijn in de posterolaterale gebieden, eivormig en breder dorsoventraal, meten 57,2% van de diameter van de ogen. Supratympanische plooi afwezig.

Afgeronde choanae, niet zichtbaar in ventrale weergave, omdat ze volledig worden bedekt door de maxillaire boog. Vomerine, maxillaire en premaxillaire tanden zijn afwezig. Tong is langwerpig, bijna twee keer langer dan breed; de achterste rand van de tong is niet ingesprongen en het achterste derde deel is niet aan de mondbodem gehecht.



FIGUUR 3. Palm (A) en voet (B) van de hand en voet van het type-exemplaar van *A. cassidyhornae* sp. nov. (foto © 2012 L. Mazariegos). Schaal = 1mm.



FIGUUR 4. Kenmerkende ventrale kleuring van *A. cassidyhornae* sp. nov. van het type plaats (A-B), Ciudad Bolívar (C) en Carmen de Atrato (D-E), vergeleken met *A. opisthomelas*: de bruin-venter vorm van Guatapé (F-H), en de wit-venter vorm van Amalfi (I-J).



AFBEELDING 5. Mannetje van *A. cassidyhornae* sp. nov. met een kikkervisje (foto © 2012 L. Mazariegos).

Hand relatief groot (Figuur 3), met een lengte gelijk aan 24,1% van de snuit-romplengte. De relatieve lengte van de vingers in oplopende volgorde van grootte is: IV<II<I<III. De punt van het cijfer IV-cijfer bereikt het midden van het voorlaatste vingerkootje van het cijfer III en het distale uiterste van het eerste cijfer bereikt de basis van de schijf van het tweede cijfer. Vingerschijven matig uitgebreid op de vingers van de hand. Gepaarde dorsale pads op de dorsale oppervlakken van de schijven zijn aanwezig. De buitenste metacarpale knobbeltjes zijn enigszins plat en afgerond, de binnenste metacarpale knobbeltjes zijn elliptisch en bevinden zich aan de basis van de eerste (I) vingers, de basale subarticulaire knobbeltjes zijn afgerond en plat over de vingers I en II. Twee afgeronde en afgeplatte subarticulaire knobbeltjes verschijnen op de cijfer III en IV vingercijfers; de laatste subarticulaire tuberkel is niet uitgesproken (Figuur 3).

De relatieve lengte van de tenen, in oplopende volgorde van grootte, is I<II<V<III<IV. De schijven van tenen zijn kleiner dan schijven van vingers. Tenen nummer II met de basale subarticulaire tuberkel niet uitpuilend. Tenen III en V met twee subarticulaire knobbeltjes en tenen IV met drie subarticulaire knobbeltjes. Boventallige plantaire knobbeltjes zijn afwezig.

Externe middenvoetsbeentje is kleiner dan de binnenste middenvoetsbeentje knobbeltjes (Figuur 3).

Verkleuring van holotype in het leven: Iris zeer donkerbruin; bijna niet te onderscheiden van zwarte pupil. Nares omringd door zwart; randen van boven- en onderkaak zijn erg donkerbruin; tympana zijn zwart. Dorsum voornamelijk helder scharlakenrood, scherp begrensd langs de randen met enkele onregelmatig verspreide zwarte spikkels en kleine onregelmatige zwarte markeringen; bij andere exemplaren kunnen zwarte vlekken een weerspiegeling zijn van aanvallen van roofdieren en mogen daarom niet worden beschouwd als een element van de dorsale kleuring. De flanken zijn lateraal rood en ventrolateraal zwart zonder dat de twee kleuren overgaan in een gradiënt, zoals te zien is bij *A. opisthomelas*. Venter grondkleur zwart met onregelmatig scherp contrasterende helder scharlakenrode onregelmatig gevormde vlekken of vlekken. Bovenste voorpoten helder scharlakenrood en getint bruin waar de boven- en onderkleur elkaar ontmoeten, met onderarm donkerbruin onder de elleboog; polsen en handen bruin met toppen van tenen en vingers beige. Dij meestal rood, onregelmatig gespikkeld met bruin; schachten meestal bruin getint met rood onregelmatig (Figuur 2).

Kleur in conserveermiddel (ethanol 70%): De donkerbruine en zwarte kleuren worden dof zwart tot donker olijkleurig in conserveermiddel. Schijven en tuberkels op handen en voeten, pupil en hoornvlies worden in de loop van de tijd grijs of bijna wit. De overwegend heldere scharlakenrode dorsale kleuring en ventrale rode vlekken en vlekken worden metaalachtig olijkleurig; patroon blijft duidelijk te onderscheiden in conserveermiddel (ethanol 70%).

Natuurlijke historie: De natuurlijke historie van deze soort is slecht bekend. We hebben personen gevonden in de gebieden die worden bestreken

met een dikke laag bladafval en waar veel schuilplaatsen beschikbaar waren. Mannetjes roepen regelmatig vanuit het bladafval of verscholen tussen boomwortels, de hele dag door, maar prominent tussen 10u-14u en na perioden van regen. De meeste roepende mannetjes werden geobserveerd in gezelschap van een vrouwtje. Tijdens een bezoek in maart en april 2012 kwamen we ook verschillende paren tegen. Mannetjes dragen 1-3 kikkervisjes (Figuur 5) op hun rug. Van mannetjes van andere soorten van de *bombetes*-groep is bekend dat ze hun kikkervisjes vrijlaten in watertanks voor bromelia's. Sommige kikkervisjes van de nieuwe soort werden gevonden in het water binnen de bloeiwijzen van *Wettinia*-palmen. Of deze soort tweeoudelijke zorg vertoont, is niet bekend.

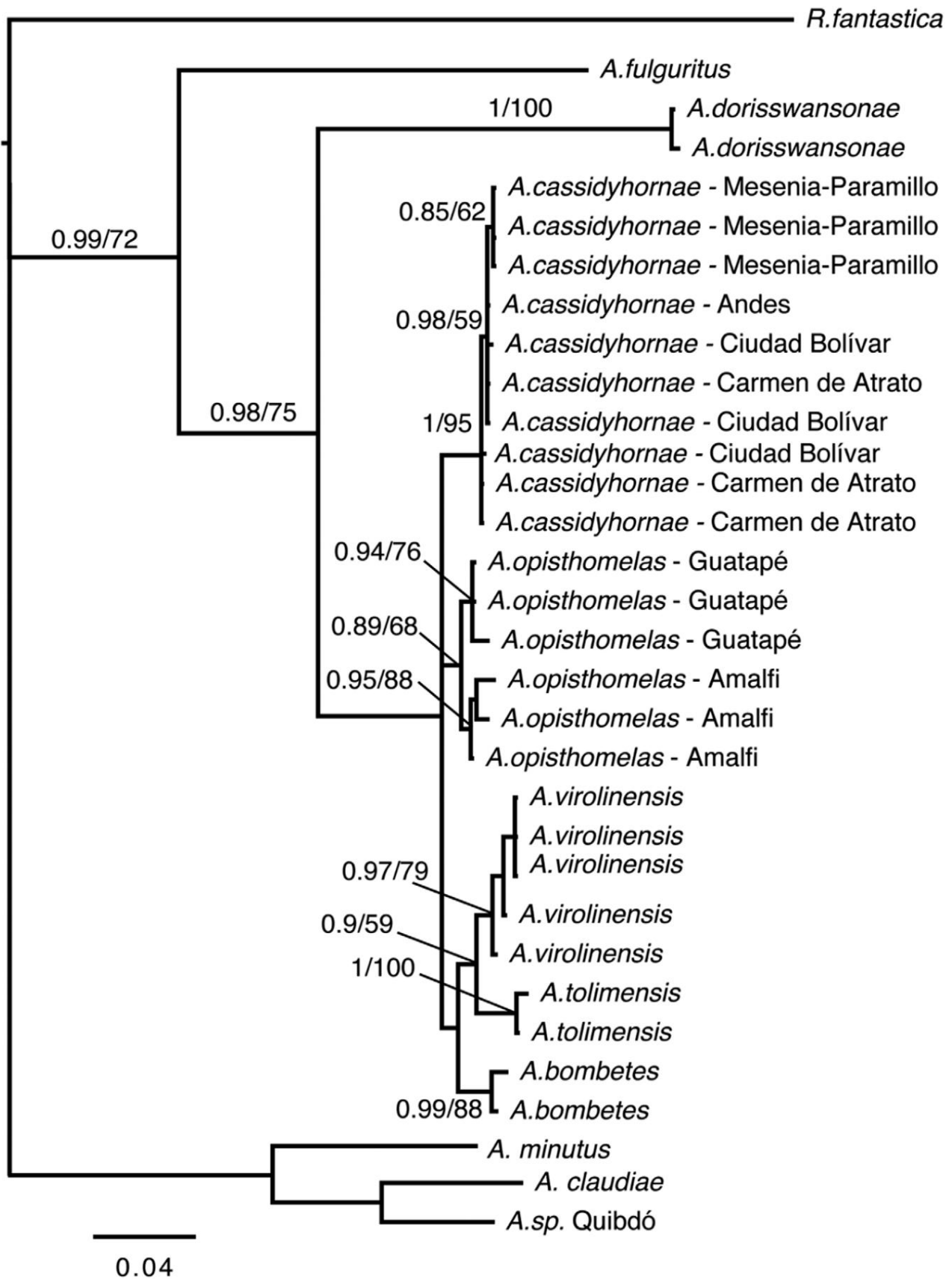
Moleculaire en fylogenetische analyses. De uiteindelijke uitlijning bestond uit 1119 bp (700 bp ondubbelzinnig uitgelijnd vanaf het Cytb-gen en 419 bp vanaf het 16S-gen). De gekozen partitioneringsstrategie was als volgt: 16S niet gepartitioneerd onder het GTR+ -model, en Cytb gepartitioneerd op codonpositie met K80+I, HKY+I en GTR+ \ddot{y} voor respectievelijk de eerste, tweede en derde positie. Zowel ML- als Bayesiaanse fylogenieën plaatsten *A. cassidyhornae* **sp. nov.** als een onafhankelijke, goed ondersteunde clade, gescheiden van andere soorten, binnen de soortgroep *bombetes*. De twee populaties waarvan de sequentie is bepaald, de wit- en de bruin-venter vormen, van *A. opisthomelas* vormden een monofyletische, zij het slecht ondersteunde groep (Figuur 6). De verkregen topologie komt ruwweg overeen met de resultaten van Brown & Twomey *et al.* (2011), maar verandert de relaties tussen *A. virolinensis*, *A. tolimensis* en *A. bombetes*, waarbij de eerste twee als wederzijds monofyletische clades worden geplaatst, en *A. bombetes* als de zustergroep van de twee. De diepere fylogenetische relaties tussen de soorten in deze groep vereisen echter nog verder onderzoek, aangezien de verkregen topologie zeer polytomisch is en niet goed ondersteund wordt op dit niveau. Binnen *A. cassidyhornae* **sp. nov.**, individuen uit het Mesenia-Paramillo Natural Reserve, Antioquia, clusteren samen in een monofyletische groep, terwijl individuen van andere plaatsen geen bewijs van genetische structurering vertonen.

De SH-tests verwierpen, op een zeer hoog niveau van statistische significantie, twee van de drie nultopologieën (H0) die *A. cassidyhornae* **sp. nov.** binnen een clade met *A. opisthomelas* ($P < 0,00001$), met *A. virolinensis* ($P < 0,00001$), en met *A. bombetes* ($P = 0,05134$). Bovendien zijn paarsgewijze genetische afstanden (K2P) tussen *A. cassidyhornae* **sp. nov.** en andere soorten binnen de *bombetes*-soortgroep varieerden tussen 0,0320-0,0677, ruim binnen het bereik van interspecifieke afstanden (Figuur 7) waargenomen voor de groep (0,0216-0,1053), en ongeveer het tienvoudige van de waargenomen intraspecifieke afstanden (0-0,0091). Al met al bieden de gereconstrueerde fylogenetische boom, de topologie (SH) tests en paarsgewijze genetische afstanden sterke ondersteuning voor *A. cassidyhornae* **sp. nov.** een aparte soort binnen de *bombetes* soortengroep.

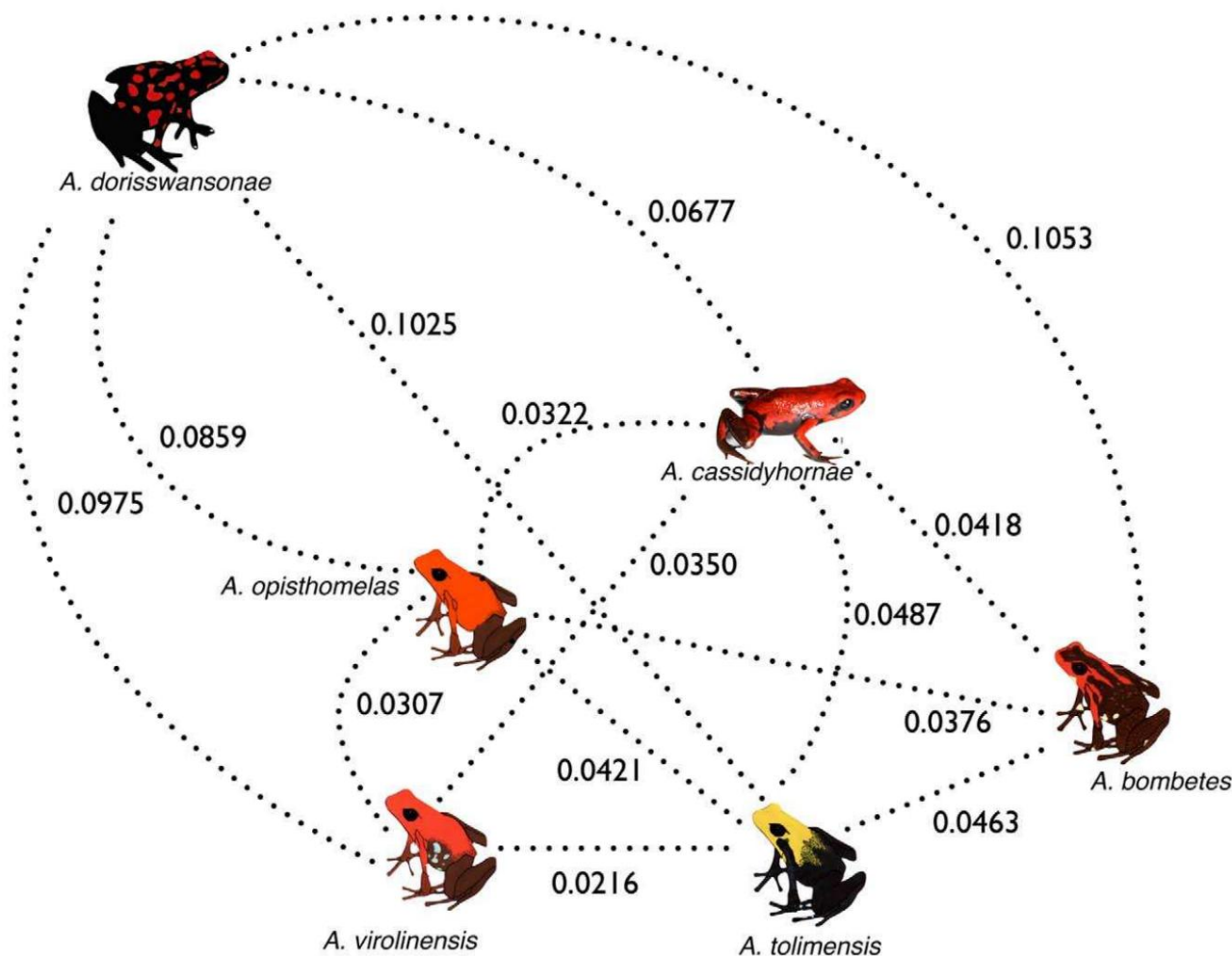
Bioakoestische analyses. Alle soorten oproepen binnen de soortengroep *Andinobates bombetes* bestaan uit lange en atonale reeksen pulsen die klinken als een 'zoem' of ratel, die vaak langer is dan 1 sec. De advertentieoproep van *A. cassidyhornae* **sp. nov.** (Figuur 8) volgt ongeveer hetzelfde patroon. Oproepen bestaan uit $234,3 \pm 20,3$ (gemiddelde \pm SD) pulsen, duren $1,94 \pm 0,26$ s, en worden vaak uitgesproken als een reeks oproepen, gescheiden door regelmatige stille intervallen van $10,1 \pm 2,1$ s. De stijgtijd is $50,0 \pm 13,2$ % van de gespreksduur. De piekoproepfrequentie is gemiddeld $4,32 \pm 0,14$ kHz en de frequentiebandbreedte $0,81 \pm 0,40$ kHz.

Het combineren van de oproepen van *A. cassidyhornae* **sp. nov.**, *A. opisthomelas* (twee plaatsen), *A. bombetes* en *A. virolinensis*, vonden we dat gespreksduur (lineaire regressie, $R^2=0.31$, $F=13.9$, $P=0.0008$, $N=16$ mannetjes), inter-call interval ($R^2=0.17$, $F=6.5$, $P=0.0162$), en het aantal pulsen per oproep ($R^2=0.12$, $F=4.3$, $P=0.0472$) nam af bij hogere temperaturen. Na het verwijderen van het temperatuureffect door het berekenen van regressieresiduen, werden de oproepen van *A. cassidyhornae* **sp. nov.** waren duidelijk gescheiden van de oproepen van de andere soorten in een tweedimensionale discriminantruimte (Figuur 9, hierboven, discriminantanalyse, Wilks' Lambda approxim. $F=13.9$, $P<0.0001$). De eerste discriminantas was goed voor 87,7% van de variatie en scheidde de oproepen van *A. cassidyhornae* **sp. nov.** van de oproep van andere soorten omdat de eerste een lagere piekfrequentie hadden (F to enter = 39,6, gestandaardiseerde discriminantcoëfficiënt = 1,10, $P < 0,0001$). De tweede discriminantas was goed voor 10,1% van de variatie en scheidde de oproepen van *A. cassidyhornae* **sp. nov.** uit de oproep van *A. bombetes* omdat de eerste langer duurden (F to enter=6,9, gestandaardiseerde discriminantcoëfficiënt=0,97, $P=0,0013$).

Wat betreft paarsgewijze soortvergelijkingen door middel van univariate (Figuur 9, hieronder) tests, werd de advertentieoproep van *A. cassidyhornae* **sp. nov.** was lager in piekfrequentie dan de oproep van *A. opisthomelas* (Tukey-Kramer HSD-test, - 0,97 kHz, $P < 0,0001$), *A. virolinensis* (- 0,71, $P < 0,0001$) en *A. bombetes* (- 0,53, $P < 0,0001$). Het was ook langer in duur (+ 0,55 s, $P=0,0058$) en bestond uit meer pulsen (+ 48 pulsen, $P=0,0356$) vergeleken met *A. bombetes*. Ten slotte was de frequentiebandbreedte groter in vergelijking met *A. virolinensis* (+ 0,40 kHz, $P=0,0220$) en *A. opisthomelas* (+ 0,35 kHz, $P=0,0246$).



FIGUUR 6. Bayesiaanse fylogenie van 10 *Andinobates* -soorten afgeleid met behulp van MrBayes. Getallen op internodiën vertegenwoordigen nodale ondersteuning als volgt: Bayesiaanse posterieure waarschijnlijkheid/RAxML bootstrap-ondersteuning. Ondersteuningswaarden voor knooppunten met posterieure kansen onder 0,8 en bootstrap-ondersteuning onder 70 worden niet getoond. *Ranitomeya Fantastica* werd gebruikt als outgroup.



FIGUUR 7. Gemiddelde interspecifieke genetische K2P-afstanden van het geamplificeerde fragment van het *Cytb*-gen tussen zes geografisch dicht bij elkaar liggende soorten van de *bombetes*-groep, waaronder *A. cassidyhornae* sp. nov. Lijnlengtes zijn ruwweg evenredig met paarsgewijze genetische afstanden.

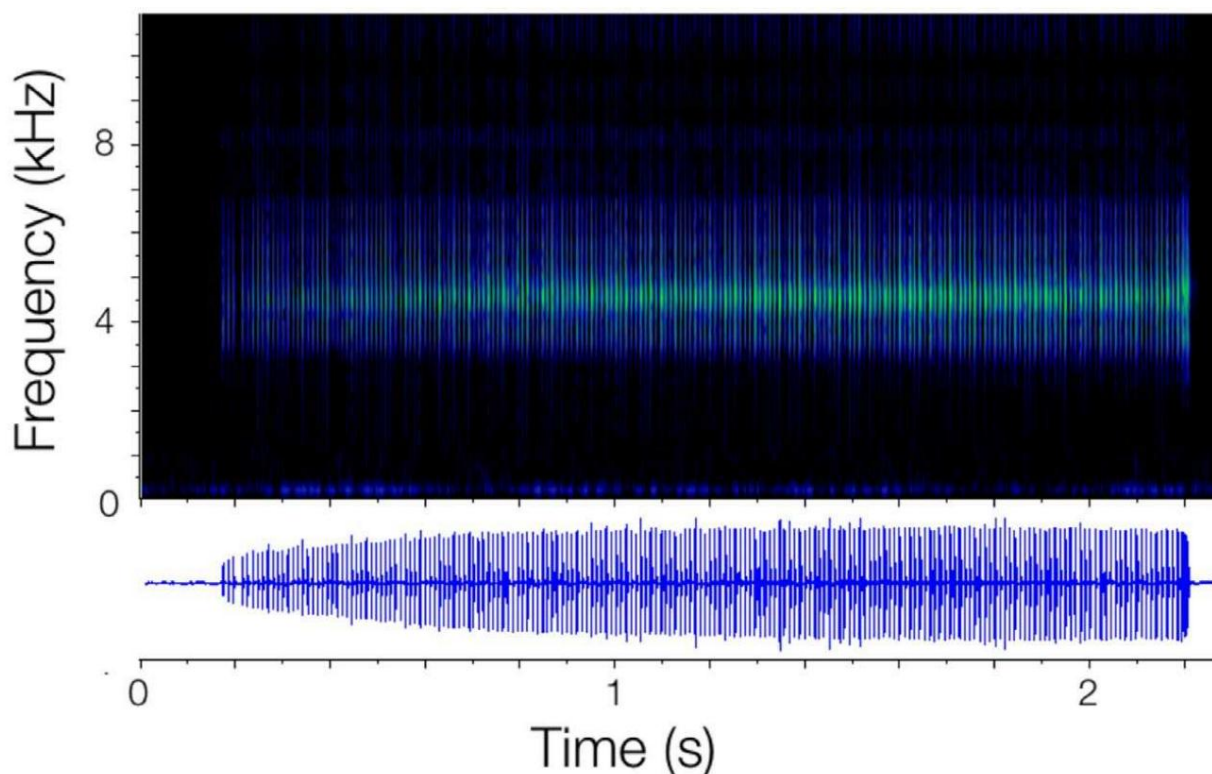
De sterke variatie tussen soorten in de piekfrequentie van de oproep kan gedeeltelijk worden toegeschreven aan gelijktijdige variatie in lichaamsgrootte. Grotere kikkers produceren gewoonlijk oproepen met lagere frequentiewaarden (bijv. Erdtmann & Amézquita 2009 voor dendrobatide kikkers) vanwege allometrische beperkingen in de grootte van het strottenhoofd. Inderdaad, toenemende piekfrequentie is ruwweg gerelateerd aan afnemende lichaamsgrootte in onze studiesoort: *A. cassidyhornae* sp. nov. is de grootste soort (gemiddelde \pm SD, $18,73 \pm 0,22$ mm, $N = 5$ geregistreerde mannetjes, deze studie), gevolgd door *A. bombetes* ($17,76 \pm 0,55$, $N = 28$ mannetjes, Myers & Daly 1980), *A. opisthomelas* ($16,80 \pm 1,24$, $N = 26$ mannen, Silverstone 1975) en *A. virolinensis* ($16,72 \pm 0,54$, $N = 127$ mannen, Valderrama-Vernaza *et al.* 2009). We hebben niet gecorrigeerd voor lichaamsgrootte-effecten op piekfrequentie, omdat we niet alle informatie hadden over lichaamsgrootte van geregistreerde personen. In ieder geval heeft alleen het verschil in oproepfrequentie waarschijnlijk belangrijke evolutionaire implicaties. Bij veel kikkersoorten lijkt de oorgevoeligheid overeen te komen met de piekfrequentie van de advertentieoproep (Capranica & Moffat 1983, zie Amézquita *et al.* 2006, 2011 voor voorbeelden van dendrobatidekikkers). Dus, verschillen in oproepfrequentie tussen lijnen zouden een frequentie-mismatch tussen zenders en ontvangers in het partnerherkenningssignaal impliceren, wat reproductieve isolatie tussen elk paar *Andinobates*-soorten die we hier hebben bestudeerd, had kunnen bevorderen.

Verspreiding, habitat en ecologie. Op de typeplaats, het natuurreservaat Mesenia-Paramillo, *Andinobates cassidyhornae* sp. nov. werd gevonden in twee fragmenten van zwaar verstoorde nevelwouden. Het terrein van ongeveer 1,52 hectare ligt op een steile berghelling met een hellingspercentage van 65% (Figuur 10). Dit bergbosfragment wordt volledig omringd door vee dat graslanden graast en landbouwgewassen. Het bosfragment daar heeft een dicht, soms gebroken bladerdak met een complexe gelaagdheid en opkomende bomen tot 20 m hoog. De dominante bomen zijn Lauraceae (*Nectandra acutifolia*, *Nectandra laurel*, *Aniba coto*, *Aiouea dubia*, *Aniba perutilis* en *Ocotea* sp.), Eik (*Quercus humboldtii*) en Ceder (*Cedrela montana*). Struiken en kleine bomen in de families

Ericaceae, Gesneriaceae, Melastomataceae, Piperaceae en Rubiaceae domineren het understory. *Cyathea* sp. boomvarens komen veel voor en epifyten zijn dicht op de meeste bomen die worden gedomineerd door de families Araceae, Bromeliaceae, Dryopteridaceae en Orchidaceae. Bromelia's zijn overwegend van het geslacht *Guzmania*. De bosbodem is bedekt met overvloedig bladafval en rottend hout. Overblijfselen van bloeiwijzen van *Wettinia kalbreyerii*-palmen komen vaak voor en dienen voor langere tijd als terrestrische waterreservoirs. Nabij dagelijkse (voornamelijk avond en vroege ochtend) bewolking van mist, nevel en neerslag zorgen voor een zeer koele en vochtige mesische omgeving.

Er werden daar geen extra waterbronnen, dwz beekjes of bronnen gevonden. De gemiddelde jaarlijkse neerslag is 2500 mm. De gemiddelde jaarlijkse regionale temperatuur is 15,0°C. Er zijn twee opvallende natte seizoenen die beginnen in maart en duren tot mei, en een ander seizoen loopt van oktober tot december. De soort is ook bekend van andere drie plaatsen die door een van de medeauteurs zijn bezocht (DM-V., figuur 1) die veel minder bekend zijn dan de typeplaats.

Ze zien er echter ongeveer hetzelfde uit in de topografie en de microhabitat van kikkers.

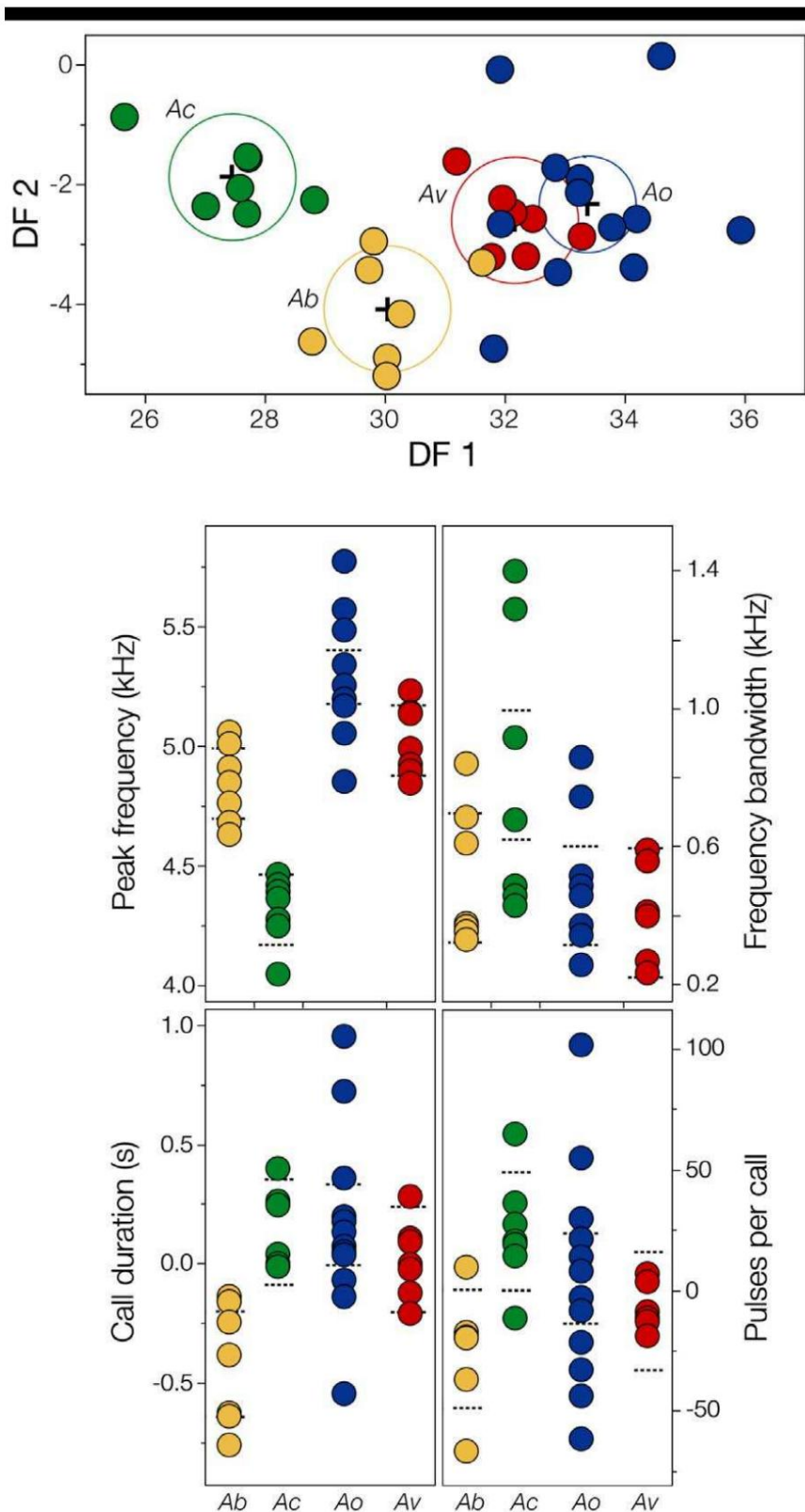


AFBEELDING 8. Sonogram (boven) en oscillogram (onder) van de advertentieoproep van *A. cassidyhornae* sp. nov. opgenomen door Ricardo Medina.

Staat van instandhouding. Bijna alle bekende plaatsen voor soorten in de *A. bombetes*-groep liggen binnen de 1200-2100 m hoge gordel. In Colombia zijn de bossen binnen dit bereik ernstig aangetast door intensieve landbouw, met name koffieplantages, wat een nationaal product van de eerste orde is. *Andinobates cassidyhornae* sp. nov. werd gevonden op vier plaatsen binnen een hoogte van 1800-2059 m (Figuur 1). Het minimale gebied van het hoogtebereik dat deze plaatsen omvat, gelijk aan het gebied dat wordt bereikt door de som van de bezette rastervierkanten (Figuur 2C in IUCN 2001), ligt tussen 200-300 km²

. Naar beste weten of ervaring is de verspreiding van soorten echter schaars, met slechts enkele van de ogenschijnlijk geschikte heuvels, die waarschijnlijk een kleine fractie van de beschikbare habitat innemen. Bovendien is het grootste deel van het geschikte bos onder de 2000 m hoogte sinds vele jaren geleden gekapt op de typelocatie, wat de potentiële verspreiding van de nieuwe soort verder beperkt.

Helaas zijn de meeste plaatsen die in deze studie zijn opgenomen, blootgesteld aan ernstige degradatie door intensieve landbouw. Verontreiniging van stroomgebieden door pesticiden, herbiciden en bodemdegradatie veroorzaakt door landbouw en begrazing van vee verslechteren hier ook het milieu. Op de typelocatie is er een lopend natuurbehoudproject waarbij de lokale gemeenschap is betrokken die grenst aan het Mesenia-Paramillo Nature Reserve en de stichting The Hummingbird Conservancy (THC). Op basis van hun biogeografische, biologische en hydrologische belang, heeft het project tot doel het percentage beschermde natuurgebieden te vergroten, en zo de oude nevelwouden en subparamo-ecosystemen in het gebied te beschermen tegen selectieve houtkap en massale ontbossing.



AFBEELDING 9. Boven: discriminerende analyse van zes spectrale en temporele parameters van de advertentie-oproepen van *A. cassidyhornae* sp. nov. (*Ac*, groene stippen), en de geografisch meest nabije soort van de *bombetes*-groep: *A. bombetes* (*Ab*, gele stippen), *A. opisthomelas* (*Ao*, blauwe stippen) en *A. virolinensis* (*Av*, rode stippen). Ellipsen geven 95% betrouwbaarheidsintervallen van het multivariate gemiddelde aan. Niet-overlappende ellipsen geven dus statistisch significante verschillen aan op het 0,05-niveau. Onder: Overeenkomstige univariate analyses van de oproepparameters die het meest hebben bijgedragen aan de discriminantanalyse. Horizontale lijnen omsluiten 95% betrouwbaarheidsintervallen van het univariate gemiddelde.



FIGUUR 10. Gezicht op de sterk versnipperde nevelwouden op de typelocatie van *A. cassidyhornae* **sp. nov.** (foto © 2012 L. Mazariegos).

Samenvattend kan worden gesteld dat het voortbestaan van deze soort op de lange termijn en onmiddellijk wordt bedreigd door zijn schijnbaar kleine verspreiding in combinatie met de zware verstoring van de oerbossen waar hij leeft. De soort is ook zeer kwetsbaar voor massale smokkel in korte tijdspannes, zoals gewoonlijk gebeurt wanneer nieuwe vormen van dendrobatide kikkers bekend worden op de illegale huisdierenmarkt. Op basis van de beschikbare informatie stellen we voor om *A. cassidyhornae* **sp. nov.** als ernstig bedreigd (A1c, B2bi, ii, iv, IUCN 2001). Verdere fylogenetische, biogeografische en taxonomische studies zijn dringend nodig om geschikte beschermingsstrategieën voor deze groep kikkers te ontwikkelen. De verkregen informatie zou een grote hulp zijn bij de ontwikkeling en uitvoering van een soortspecifiek beheerplan voor *A. cassidyhornae* **sp. nov.**

Dankbetuigingen

We zijn Dr. Stuart Pimm, Doris Duke Professor of Conservation Ecology aan Nicholas School of the Environment, Duke University, dankbaar voor zijn steun aan het Mesenia-Paramillo Natural Reserve en zijn bijdragen aan de beschrijving van de soort. Het Onderzoeksfonds aan de Universidad del Tolima, project 430212 en de Faculteit Wetenschappen, aan de Universidad de los Andes hebben financiële steun verleend aan het veldwerk en de moleculaire analyses. Manuel Bernal, Claudia Montes en María Triana waren erg behulpzaam bij de morfometrische metingen. De familie Agudelo Jaramillo en Uriel Rendón hielpen ons in het veld en Corantioquia verleende de vergunning om een biologisch onderzoek uit te voeren van het natuurreservaat Mesenia-Paramillo (vergunning nr. 16698 van 7 maart 2012).

Referenties

- Amézquita, A., Hödl, W., Lima, AP, Castellanos, L., Erdtmann, L. & de Araújo, MC (2006) Maskering van interferentie en de evolutie van het akoestische communicatiesysteem in de Amazone dendrobatid kikker *Allobates femoralis*. *Evolutie*, 60, 1874-1887.
- Amézquita, A., Flechas, SV, Lima, AP, Gasser, H. & Hödl, W. (2011) Akoestische interferentie en herkenningsruimte binnen een complexe verzameling dendrobatide kikkers. *Proceedings van de National Academy of Sciences*, VS, 108, 17058-17063. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1104773108>
- Bernal, MH, Luna-Mora, VF, Gallego, O. & Quevedo, A. (2007) Een nieuwe soort gifkikker (Amphibia: Dendrobatidae) uit de Andesgebergte van Tolima, Colombia. *Zootaxa*, 1638, 59-68.
- Boulenger, GA (1899) Beschrijvingen van nieuwe batrachians in de collectie van het British Museum (Natural History). *Annalen en*

- Tijdschrift voor natuurlijke historie*, 3, 273-277. <http://dx.doi.org/10.1080/00222939908678122>
- Brown, JL, Twomey, E., Amézquita, A., Barbosa De Souza, M., Caldwell, JP, Lötters, S., Von May, R., Melo-Sampaio, PR, Mejía Vargas, D., Perez- Peña, P., Pepper, M., Poelman, EH, Sanchez-Rodriguez, M. & Summers, K. (2011) Een taxonomische herziening van het neotropische gifkikkergeslacht *Ranitomeya* (Amphibia: Dendrobatidae). *Zootaxa*, 3083, 1-120.
- Capranica, RR & Moffat, JM (1983) Neurogedragscorrelaten van geluidscommunicatie bij anuranen. In: Ewert JP & Capranica RR (Eds.), *Vooruitgang in Vertebrate Neuroethology*, Ingle D, Plenum, New York, pp 701-730. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4684-4412-4_36
- Drummond, A., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., Kearse, M., Moir, R., Stones-Havas, S., Sturrock, T., Thierer, T & Wilson, A. (2010) Geneious v5.1. Beschikbaar op <http://www.geneious.com/> (geraadpleegd op 26/08/2012).
- Edgar, RC (2004) MUSCLE: uitlijning van meerdere sequenties met hoge nauwkeurigheid en hoge doorvoer. *Nucleinezuuronderzoek*, 32, 1792-1797. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Erdtmann, L. & Amézquita, A. (2009) Differentiële evolutie van advertentie-oproepkenmerken bij pijlgifkikkers (Anura: Dendrobatidae). *Ethologie*, 115, 801-811. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0310.2009.01673.x>
- Felsenstein, J. (1981) Evolutionaire bomen van DNA-sequenties: een benadering met maximale waarschijnlijkheid. *Journal of Molecular Evolution*, 17, 368-376. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01734359>
- Grant T., Frost D., Caldwell J., Gagliardo R., Haddad CF, Kok PJ, Means DB, Noonan BP, Schargel WE & Wheeler WC (2006) *Fylogenetische systematiek van pijlgifkikkers en hun verwanten (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae)*. *Bulletin van het American Museum of Natural History*, 299, 1-262. [http://dx.doi.org/10.1206/0003-0090\(2006\)299\[1:PSODFA\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1206/0003-0090(2006)299[1:PSODFA]2.0.CO;2)
- Kimura, M. (1980) Een eenvoudige methode voor het schatten van evolutionaire snelheden van basesubstituties door middel van vergelijkende studies van nucleotidesequenties. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111-120. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01731581>
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, SYW & Guindon, S. (2012) PartitionFinder: gecombineerde selectie van partitioneringsschema's en substitutiemodellen voor fylogenetische analyses. *Moleculaire biologie en evolutie*, 29, 1695-1701. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mss020>
- Madisson, W. & Madisson, D. (2011) *Mesquite: een modulair systeem voor evolutionaire analyse*, ver. 2.75. <http://mesquiteproject.org> (geraadpleegd op 26/08/2012).
- McDiarmid, RW (1994) Voorbereiding van amfibieën als wetenschappelijke exemplaren. In: Heyer, WR, Donnelly, MA, McDiarmid, RW, Hayek, LA.C. & Foster, MS (Eds.), *Meten en bewaken van biologische diversiteit: standaardmethoden voor amfibieën*. Smithsonian Institution Press. Washington, blz. 289-297.
- Myers, CW & Daly, J. (1976) Een nieuwe soort gifkikker (*Dendrobates*) uit Andes Ecuador, inclusief een analyse van de huidtoxines. *Occasional Papers van het Museum of Natural History The University of Kansas Lawrence, Kansas*, 59, 1-12.
- Myers, CW & Daly, J. (1980) Taxonomie en ecologie van *Dendrobates bombetes*, een nieuwe Andes-gifkikker met nieuwe huidtoxines. *American Museum Transactions*, 2694, 1-23.
- Palumbi, S., Martin, A., Romano, S., McMillan, O., Stice, L. & Gabowski, G. (1991) *The Simple Fool's Guide to PCR*. afdeling van Zoölogie, Universiteit van Hawaï, Hawaï, 45 pp.
- R Ontwikkeling kernteam. (2011) *R: Een taal en omgeving voor statistische gegevensverwerking*. R Stichting voor statistiek computergebruik. Oostenrijk.
- Rambaut, A. & Drummond, A. (2007) *Tracer v1.5*. Beschikbaar op <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer> (geraadpleegd op 26/08/2012)
- Rannala, B. & Yang, Z. (1996) Waarschijnlijkheidsverdeling van moleculaire evolutionaire bomen: een nieuwe methode voor fylogenetische gevolgtrekking. *Journal of Molecular Evolution*, 43, 304-311. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02338839>
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, JP (2003) MrBayes 3: Bayesiaanse fylogenetische gevolgtrekking onder gemengde modellen. *Bio-informatica*, 19, 1572-1574. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
- Rueda-Almonacid, JV, Rada, M., Sánchez, S., Velásquez-Alvarez, A. & Quevedo, A. (2006) Twee nieuwe en uitzonderlijke pijlgifkikkers van het geslacht *Dendrobates* (Anura: Dendrobatidae) uit de noordoostelijke flank van de Cordillera Central van Colombia. *Zootaxa*, 1259, 39-54.
- Ruiz-Carranza, PM, & Ramirez-Pinilla, MP (1992) Een nieuwe soort *Myniobates* (Anura: Dendrobatidae) uit Colombia. *Lausanne*, 61, 1-16.
- Santos, JC & Cannatella, DC (2011) Fenotypische integratie komt voort uit aposematisme en schaal bij gifkikkers. *Proceedings van de National Academy of Sciences*, 108, 6175-6180. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1010952108>
- Santos JC, Coloma, LA, Summers, K., Caldwell, JP, Ree, R. & Cannatella, DC (2009) De diversiteit van amfibieën in het Amazonegebied is voornamelijk afgeleid van laat-mioceen Andes-lijnen. *PLoS Biologie*, 7, 3. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1000056>
- Schliep, KP (2011) Phangorn: fylogenetische analyse in R. *Bioinformatics*, 27, 592-593. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btq706>
- Shimodaira, H. & Hasegawa, M. (1999) Meerdere vergelijkingen van log-waarschijnlijkheden met toepassingen op fylogenetische gevolgtrekking. *Moleculaire biologie en evolutie*, 16, 1114-1116. <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026201>
- Silverstone PA (1975) Een herziening van de pijlgifkikkers van het geslacht *Dendrobates* Wagler. *Natuurhistorisch Museum van Los Angeles County, Wetenschapsbulletin*, 21, 1-55.
- Stamatakis, A. (2006) RAxML-VI-HPC: op maximale waarschijnlijkheid gebaseerde fylogenetische analyses met duizenden taxa en gemengde modellen. *Bio-informatica*, 22, 2688-2690. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btl446>
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011) MEGA5: moleculaire evolutionaire genetica-analyse met behulp van maximale waarschijnlijkheid, evolutionaire afstand en maximale spaarzaamheid methoden. *Moleculaire biologie en evolutie*, 28, 2731-2739. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- Valderrama-Vernaza M., Ramírez-Pinilla MP & Serrano-Cardozo VH (2009) Dieet van de Andes-kikker *Ranitomeya virolinensis* (Athesphatanura: Dendrobatidae). *Journal of Herpetology*, 43, 114-123. <http://dx.doi.org/10.1670/07-247R1.1>