



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

**Filogenia molecular del grupo *Plectrohyla bistincta*
(Anura: Hylidae)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(SISTEMÁTICA)

PRESENTA:

ITZUE WENDOLIN CAVIEDES SOLIS

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DR. ADRIÁN NIETO MONTES DE OCA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. GABRIELA PARRA OLEA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM
DR. ALEJANDRO ZALDÍVAR RIVERÓN
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, D.F. JUNIO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

**Filogenia molecular del grupo *Plectrohyla bistincta*
(Anura: Hylidae)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(SISTEMÁTICA)

PRESENTA:

ITZUE WENDOLIN CAVIEDES SOLIS

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DR. ADRIÁN NIETO MONTES DE OCA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. GABRIELA PARRA OLEA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM
DR. ALEJANDRO ZALDÍVAR RIVERÓN
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, D.F. JUNIO 2013



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/254/13

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **4 de marzo de 2013**, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (SISTEMÁTICA)** del (la) alumno (a) **CAVIEDES SOLIS ITZUE WENDOLIN** con número de cuenta **302082285** con la tesis titulada "**Filogenia molecular del grupo *Plectrohyla bistincta* (Anura: Hylidae)**", realizada bajo la dirección del (la) **DR. ADRIÁN NIETO MONTES DE OCA**:

Presidente: DRA. NORMA LETICIA MANRÍQUEZ MORÁN
Vocal: DRA. LIVIA SOCORRO LEÓN PANIAGUA
Secretario: DRA. GABRIELA PARRA OLEA
Suplente: DR. JUAN JOSÉ MORRONE LUPI
Suplente: DR. ALEJANDRO ZALDÍVAR RIVERÓN

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 20 de mayo de 2013.

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
Coordinadora del Programa

MCAA/MJFM/ASR/mnm

Agradecimientos

Gracias al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Gracias al CONACyT por el apoyo económico de la beca de maestría y beca mixta y a la UNAM por la beca PAEP.

Gracias por el apoyo económico a los proyectos de investigación DGAPA, UNAM (PAPIIT no. IN 224009), CONACyT no 154093 y National Science Foundation No. DEB-0613802.

Gracias al Dr. Jonathan Campbell, John Wiens y Moisés Kaplan por la donación de tejidos, a las colecciones por el préstamo de ejemplares para la revisión morfológica, tanto nacionales: Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias, e Instituto de Biología, UNAM, como a las colecciones de Estados Unidos: Kansas University, California Academy of Sciences, Field Museum of Natural History, University of Illinois Museum of Natural History, Natural History Museum of Los Angeles County, University of Michigan, AMNH, Museum of Vertebrate Zoology, University of Texas at Arlington.

Gracias al Dr. Adrián Nieto por recibirme en su laboratorio y apoyarme en mi proyecto, por el tiempo y la dedicación como tutor y por enseñarnos a trabajar meticulosamente para hacer las cosas bien aunque nos tomen más tiempo.

Gracias a mi comité tutorial por todo el apoyo durante el desarrollo de esta tesis, con sus valiosos comentarios y correcciones que ayudaron a mejorar el trabajo, la Dra. Gabriela Parra Olea y el Dr. Alejandro Zaldívar Riverón

Agradecimientos a título personal

Quiero agradecer a mi mamá por el apoyo incondicional todos estos años, por darme las herramientas necesarias y el carácter para salir adelante. Gracias por enseñarme que yo siempre puedo. Gracias a mi hermano Mihail y a Arge por estar ahí. Gracias a mi familia por confiar en que puedo cruzar cualquier obstáculo, a mi abuelito Miguel, a mis tías: Flor, Irma, Jose y mis tíos Javier y Albert gracias por ser un ejemplo de fortaleza. Gracias a mis primos por amenizar mis fines de semana con su alegría y ocurrencias, Eduardo, Esteban, Emmanuel, Jimena y Arturo.

Gracias a Miguel por todo, por ser mi amigo, mi confidente, mi colega, y mi familia. Por darme la salud mental y el cariño necesario estos tres años para terminar la maestría, y enseñarme que no importa cuan difícil se vea todo, siempre pasa.

Gracias a Luis Felipe por que no importa lo que pase, siempre vamos a estar ahí para el otro. Gracias por los consejos, los regaños, los dulcesitos y por buscar ranas imaginarias con migo hasta el fin del mundo. Por estar ahí para escucharme siempre y creer en mi.

Gracias a mis compañeros del laboratorio que se volvieron como mis hermanitos. Gracias a Huicho por todas las tardes y noches que nos acompañamos trabajando en el laboratorio hasta tarde, por sus valiosas aportaciones en el desarrollo de este proyecto y por siempre estar dispuesto a compartir su conocimiento. Gracias a Isrris por todas las salidas al campo, las carcajadas, y las platicas serias sobre nuestros proyectos. Gracias a Rubi por enseñarnos a usar los programas, por fomentar los seminarios, por ayudarnos en el laboratorio, gracias por que siempre tienes tiempo para resolver nuestras dudas de los análisis. Gracias a Belen, a Campillo y Oscarito por su amistad y por hacer más ameno el cubiculo de estudiantes.

Gracias a la Dra. Gabriela Parra por permitirme trabajar en su laboratorio antes de entrar a la maestría y en particular a Juan Carlos Windfiel Pérez por su amistad, confianza y por todas las tardes que se tomo para enseñarme las técnicas y hacerme una persona más competente en el laboratorio y en otras areas, mil gracias!.

Gracias a mis amigos que han estado ahí a pesar del tiempo, Diana Pato, Rebeca, Jorge, y Gerardo. Gracias a Yire, Pablo y Luis por estudiar con migo y tomar los cursos para poder pasar el examen de la maestría, a los que hicieron mucho más leve el paso por las clases: Dianita, Hugo, Gualberto, Omar, Fauno, Laura, Alex, Jesús, Poncho, Alejandro Montufar y Marco, y a los que me hicieron más leve los meses en Kansas: Lazaro, Jose Manuel y Andrés

Gracias a todas las personas que fueron con migo al campo a buscar Plectrohylas: Patula, Isrra, Sean, Tom, Andrea, Daniel, Peter, Mundo, Rodrigo Villegas y Karlo. También a todas las personas en las comunidades que nos abrieron las puertas para facilitarnos el trabajo de campo.

A mi mamá

Por darme la vida y enseñarme a luchar por lo que quiero para siempre tratar ser mejor.

INDICE

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Objetivos	11
Métodos	
Muestreo de taxones	11
Datos	12
Protocolo de Laboratorio	13
Análisis de datos	15
Análisis de hipótesis alternativas	16
Revisión de morfología de caracteres	17
Resultados	
Datos moleculares	19
Relaciones filogenéticas	19
Revisión morfológica	29
Análisis de hipótesis alternativas	29
Determinación de los especímenes de los tejidos donados	30
Notas sobre la distribución de las especies	30
Discusión	
Relaciones filogenéticas	31
Especies no incluidas en la filogenia molecular	38
Conclusiones	39
Literatura citada	40

INDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Figura 1. Distribución del género <i>Plectrohyla</i>	4
Figura 2. Distribución de la especie <i>Plectrohyla bistincta</i> .	4
Figura 3. Filogenia del género <i>Plectrohyla</i> (Duellman, 2001)	9
Figura 4. Filogenia molecular género <i>Plectrohyla</i> (Wiens <i>et al.</i> , 2010)	10
Figura 5. Filogenia molecular género <i>Plectrohyla</i> (Pyron y Wiens, 2011)	10
Figura 6. Árboles bayesianos obtenidos a partir de los genes nucleares	23
Figura 7. Árboles bayesianos obtenidos a partir de los genes mitocondriales	24
Figura 8. Árbol bayesiano obtenidos a partir de los genes nucleares concatenados	26
Figura 9. Árbol bayesiano obtenidos a partir de los genes mitocondriales concatenados	27
Figura 10. Árbol bayesiano obtenidos a partir de los cinco genes concatenados	28
Cuadro 1. Distribución de las especies del grupo <i>P. bistincta</i>	7
Cuadro 2. Numero de salidas y localidades del trabajo de campo.	11
Cuadro 3. Oligonucleotidos utilizados en el presente estudio para cada gen	14
Cuadro 4. Concentraciones y volumen utilizados en la reacción de PCR	14
Cuadro 5. Perfil de temperaturas de PCR para cada gen	14
Cuadro 6. Modelos evolutivos de sustitución de bases por partición	16
Anexo 1. Anexo 1. Secuencias utilizadas en el presente estudio	45

Resumen

El género de ranas *Plectrohyla*, con 42 especies reconocidas, es uno de los géneros más diversos de la familia Hylidae. Está compuesto por dos clados: el grupo *P. guatemalensis*, que incluye 18 especies y se distribuye de México a Centroamérica, y el grupo *P. bistincta*, que incluye 24 especies endémicas de México, las cuales se distribuyen en el sur del estado de Durango y desde los estados de Jalisco e Hidalgo (por la vertiente del Pacífico y Atlántico respectivamente) hasta el oeste del Istmo de Tehuantepec en el estado de Oaxaca. La mayoría de las especies del grupo *P. bistincta* son microendémicas y están consideradas en peligro de extinción, ya que sus registros son escasos o no cuentan con alguno en los últimos 20 años. Las relaciones entre las especies del grupo *P. bistincta* son poco conocidas y la filogenia molecular más reciente sólo incluye 12 de las 42 especies conocidas (ocho del grupo *P. bistincta*). El objetivo principal de este estudio fue investigar la monofilia del grupo *P. bistincta* y las relaciones filogenéticas entre sus especies. El estudio incluyó 17 especies del grupo *P. bistincta*, y se basó en secuencias de dos genes mitocondriales (ND1 y 12S) y tres nucleares (Rag-1, Rhod y POMc). Para evaluar la monofilia del grupo, se incluyeron cuatro representantes del grupo *P. guatemalensis* y los géneros *Exerodonta* y *Ecnomiohyla*. Se realizaron análisis bayesianos para cada gen, y una vez que se corroboró que no existían conflictos fuertemente apoyados entre las hipótesis se realizaron tres análisis concatenados: el primero para los dos genes mitocondriales, el segundo para los tres genes nucleares y el tercero para los cinco genes. Las relaciones entre las 17 especies incluidas del grupo *P. bistincta* sugiere que (1) dos de estas especies no son válidas (*P. cyclada* y *P. ephemera*), (2) la especie putativa de amplia distribución *P. bistincta* está compuesta por tres especies, así como (3) la existencia de dos especies nuevas para el género.

Abstract

The genus *Plectrohyla* includes 42 species and is one of the most diverse genera of the Hylid family. This genus includes two main clades: the *P. guatemalensis* group, which includes 18 species distributed eastward from the Isthmus, Mexico, to El Salvador and Honduras in Central America, and the *P. bistincta* group, which is endemic to Mexico and with 24 species distributed in the south of the Durango state and from the Hidalgo and Jalisco states (through the Pacific and Atlantic versant respectively) until the westward of the Isthmus of Tehuantepec in Oaxaca state. Most of these *P. bistincta* group species are microendemic, and because they have been only occasionally recorded or not recorded at all during the last 20 years, they are considered endangered species. The relationships among the species in each of the above groups are still poorly known, only 12 of the 42 species have been included in the most recent phylogenetic analyses of the genus (eight species of the *P. bistincta* group). The main goal of this project is to investigate the monophyly of the *P. bistincta* group and the phylogenetic relationships within the group. We present a phylogenetic analysis of 17 species of the group using data from two mitochondrial genes (ND1 and 12s) and three nuclear genes (Rag-1, Rhod, and POMc). To evaluate the monophyly of the group, we included four species of the *P. guatemalensis* group and the genera *Exerodonta* and *Ecnomiohyla*. Data analysis was performed using Bayesian methods for each gene and after corroborated that not exist conflicts with strongly support between the hypothesis, the analysis was performed concatenated: for the two mitochondrial genes, for the three nuclear genes and for the five genes. The phylogenetic hypothesis generated by the relationship with the 17 species of the group *P. bistincta* suggests that (1) two of these species are not valid (*P. cyclada* y *P. ephemera*), (2) the putative species widely distributed *P. bistincta* is a complex of three species, and (3) the discovered two new species of the genus.

Introducción

El género *Plectrohyla* (Brocchi, 1877), con 42 especies reconocidas, es uno de los géneros más diversos de anuros de la familia Hylidae y la subfamilia Hylinae (Faivovich *et al.*, 2005). Este género es endémico de Mesoamérica y sus especies se han dividido en dos grupos: el grupo *P. guatemalensis*, con 18 especies que se distribuyen desde el Istmo de Tehuantepec, México, hacia el sureste hasta El Salvador y Honduras, y el grupo *P. bistincta*, con 24 especies endémicas de México que se distribuyen principalmente en las zonas montañosas de México al oeste del Istmo de Tehuantepec (Frost, 2013; Anfibiaweb, 2013). La mayoría de las especies en este grupo son microendémicas (p. ej., 10 especies solo se conocen de su localidad tipo), y sólo una (*P. bistincta*) presenta una distribución amplia, la cual abarca desde el sur del estado de Durango y los estados de Jalisco e Hidalgo (por las vertientes del Pacífico y Atlántico, respectivamente) hacia el sureste hasta el Istmo de Tehuantepec en el estado de Oaxaca (Fig. 1 y 2). La mayor parte de las especies del grupo *bistincta* habitan en bosque de pino encino en elevaciones que van de los 1300 a los 3000 msnm, exceptuando *P. pachyderma*, que habita en bosque mesófilo de montaña. Estas especies pueden encontrar sobre la vegetación o sobre las rocas cerca de los arroyos, y durante la temporada de secas dentro de las bromelias.

Duellman (1964) creó el grupo *Hyla bistincta* (= grupo *Plectrohyla bistincta*) para agrupar cuatro especies: *P. bistincta* (Cope, 1877), *P. crassa* (Brocchi, 1877), *P. robertorum* (Taylor, 1940), *P. pachyderma* (Taylor, 1942), y a *P. charadricola* (Duellman, 1964) descrita en el mismo trabajo. Este autor distinguió a estas especies de otros grupos de hílidos de México y Centroamérica por los siguientes caracteres: dedos largos con membrana corta, ausencia del hueso cuadradoyugal, dígito extra en el lado preaxial del pulgar (prepollex) no prominente, y fórmula dentaria de las larvas consistente en 2-3 hileras de dientes y dos o más hileras de papilas labiales. Sin embargo, de estos caracteres solo los últimos tres se presentan en las especies originalmente descritas en el grupo, así como en las especies descritas posteriormente. En los 40 años siguientes, se describieron 13 especies nuevas dentro del grupo *P. bistincta*, todas las cuales presentan los caracteres diagnósticos mencionados por Duellman (1964).

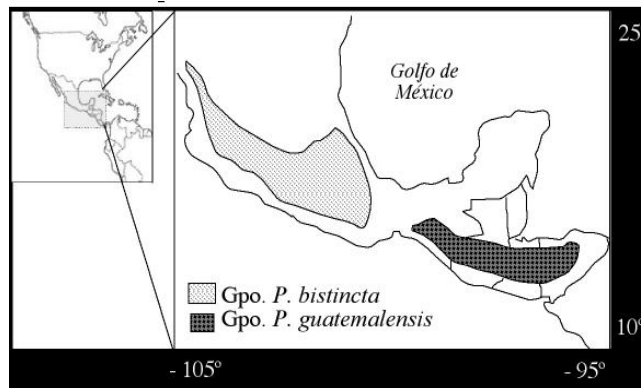


Figura 1. Distribución del género *Plectrohyla* (modificado de Duellman, 2001)

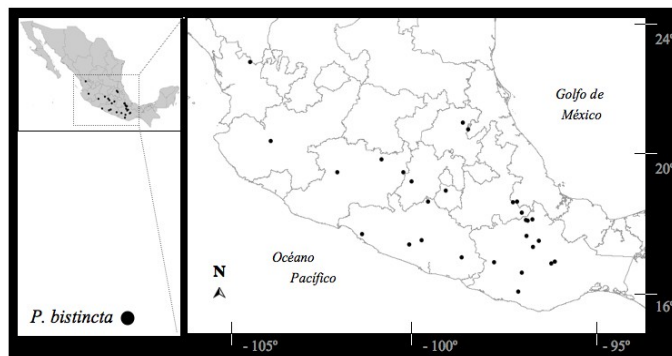


Figura 2. Distribución de la especie *Plectrohyla bistincta*.

Faivovich et al. (2005) realizaron un análisis filogenético de la familia Hylidae utilizando datos morfológicos y moleculares, y redefinieron al género *Plectrohyla*. De acuerdo con su definición, *Plectrohyla* quedó integrado por dos grupos: el grupo *P. guatemalensis* (previamente el género *Plectrohyla*) y el grupo *P. bistincta* (previamente el grupo *Hyla bistincta*). Este último quedó conformado por las 18 especies descritas previamente dentro del grupo *Hyla bistincta* y cuatro especies que fueron transferidas al grupo *H. bistincta*, dos del grupo *Hyla miotympanum*: *P. arborescandens* (Taylor, 1938) y *P. cyclada* (Campbell y Duellman, 2000), y dos del grupo *Hyla hazelae*: *P. hazelae* (Taylor, 1940) y *P. thorectes* (Adler, 1965). Finalmente, Meik et al., (2005) y Meik et al., (2006) describieron *P. ephemera* y *P. miahuatlanensis*, respectivamente, dentro del grupo *P. bistincta*, con lo cual el grupo quedó conformado en su totalidad. La lista de las especies del grupo *P. bistincta*, con el autor, año de descripción y distribución geográfica se presenta en el cuadro 1.

Conforme aumentó el número de especies dentro del grupo *P. bistincta*, varios autores sugirieron algunos agrupamientos dentro del mismo tomando en cuenta distintos caracteres morfológicos. Adler (1965) reconoció dos subgrupos: uno compuesto de especies grandes y robustas con piel gruesa (*P. bistincta*, *P. crassa*, *P. pachyderma*, *P. pentheter* y *P. robertsorum*), y otro por especies de tamaño medio, con extremidades esbeltas y piel delgada (*P. chryses* y *P. charadricola*). Duellman (1968) discrepó con Adler y propuso el reconocimiento de tres subgrupos: (1) especies con una vaina grande alrededor de la cloaca (*P. bistincta* y *P. pentheter*), (2) especies con membrana axilar y que carecen de excrecencias nupciales (*P. chryses* y *P. charadricola*), y (3) especies con cabeza corta, hocico redondeado, vaina corta alrededor de la cloaca y excrecencias nupciales presentes (*P. crassa*, *P. pachyderma*, *P. robertsorum* y *P. siopela*). Posteriormente Adler y Dennis (1972) retomaron los dos subgrupos propuestos por Adler (1965) incluyendo a las especies subsecuentemente descritas: (1) especies grandes y robustas con piel gruesa (*P. bistincta*, *P. crassa*, *P. pachyderma*, *P. pentheter* y *P. bogertae*) y (2) especies de tamaño medio, con extremidades esbeltas y piel delgada (*P. chryses*, *P. charadricola*, *P. mykter* y *P. siopela*). En ninguno de estos casos se puso a prueba la hipótesis de la monofilia de dichos agrupamientos mediante análisis filogenéticos. Dichos autores tampoco incluyeron en sus estudios a todas las especies del grupo.

Caldwell (1974) realizó un análisis discriminante entre las 12 especies incluidas hasta entonces en el grupo *H. bistincta*, e incluyó a *H. arborescandens* (Taylor, 1938), especie ubicada entonces en el grupo *H. miotympanum* pero que comparte algunas características con el grupo *H. bistincta*. Entre los caracteres morfológicos utilizados en su análisis, destacan: el tamaño del cuerpo, la forma del hocico, presencia/ausencia de sacos bucales, patrón de coloración, presencia/ausencia de excrecencias nupciales, presencia/ausencia de la membrana axilar, longitud del tímpano, de la tibia y fórmula de la membrana digital, caracteres que son ampliamente utilizados como diagnósticos entre las especies del grupo. Los resultados del análisis estadístico de Caldwell sugirieron que las 12 especies del grupo *H. bistincta* e *H. arborescandens* constituyen en realidad cuatro grupos de especies. Sin embargo, el autor consideró a estos subgrupos como preliminares debido al

número pequeño de ejemplares disponibles de algunas especies y la consiguiente escasez de datos.

Duellman (2001) propuso una hipótesis de las relaciones filogenéticas del grupo *Hyla bistincta* con base en datos morfológicos. En su estudio incluyó a las 17 especies descritas hasta entonces para el grupo *H. bistincta* (actualmente grupo *P. bistincta*), al género *Plectrohyla* (actualmente grupo *P. guatemalensis*) y la especie *Ecnomiohyla miotympanum* como grupos externos. Con base en el árbol resultante, el autor sugirió que los datos disponibles apoyaban la monofilia del grupo *H. bistincta*, y que este grupo, en conjunto con las especies del entonces género *Plectrohyla*, conformaban un grupo monofilético (el género *Plectrohyla* actual; Fig. 3) apoyado por ocho sinapomorfías morfológicas, con lo cual confirmó sugerencias previas de algunos autores de que estos dos grupos de especies son grupos hermanos (Duellman, 1964; Duellman, 1970; Duellman y Campbell, 1992). Sin embargo, en este trabajo el autor señaló que muchas características externas de los anuros, y particularmente de los hílidos, como los pliegues tarsal y torácico, la forma de la cabeza y la textura de la piel son difíciles de caracterizar para análisis filogenéticos, y las sinapomorfías del género en su mayoría son caracteres osteológicos.

Se han publicado varias hipótesis filogenéticas de la familia Hylidae basadas en datos moleculares que incluyen al grupo *P. bistincta*. La primera fue propuesta por Faivovich *et al.* (2005), con base en un análisis de parsimonia que incluyó nueve marcadores (cuatro mitocondriales y cinco nucleares). En dicho estudio se redefinió al género *Plectrohyla*, el cual quedó compuesto por dos grupos: *P. bistincta* y *P. guatemalensis*. En el análisis molecular se incluyeron cinco y tres especies de cada grupo, respectivamente. Posteriormente, otros autores implementaron análisis bayesianos. Wiens *et al.* (2005) y Smith *et al.* (2005) incluyeron dos especies del grupo *P. guatemalensis*, una especie del grupo *P. bistincta* (*P. pentheter*), y usaron cuatro marcadores, dos mitocondriales y dos nucleares. En las hipótesis resultantes de estos análisis, se corroboró la monofilia del género *Plectrohyla* con valores de soporte altos. Sin embargo, no se puso a prueba en este trabajo la monofilia de los grupos ni las relaciones entre sus especies

Cuadro 1. Distribución de las especies del grupo *P. bistrincta*

Especie	Autor(es)	Localidad tipo	Distribución previa al presente estudio
<i>P. ameibothalame</i>	Canseco-Márquez <i>et al.</i> (2002)	Oaxaca: Yosocuno, San Pedro Nopala	Yosocuno y Nativitas, Oaxaca
<i>P. arborescandens</i>	Taylor (1938)	Veracruz: Acultzingo	Sierra Madre Oriental de Puebla, Tlaxcala y Veracruz
<i>P. bistrincta</i>	Cope (1877)	Veracruz: Lagunas de San Bernardino	Sur del estado de Durango y desde los estados de Jalisco e Hidalgo (por la vertiente del Pacífico y Atlántico respectivamente) hasta el oeste del Istmo de Tehuantepec en el estado de Oaxaca
<i>P. calthula</i>	Ustach <i>et al.</i> (2000)	Oaxaca: Totontepec	Totontepec y Zacatepec en la Sierra Mixe, Oaxaca
<i>P. calvicollina</i>	Toal (1994)	Oaxaca: Cerro Pelón, Sierra de Juárez	Localidad tipo
<i>P. celata</i>	Toal y Mendelson (1995)	Oaxaca: Cerro Pelón, Sierra de Juárez	Localidad tipo
<i>P. cembra</i>	Caldwell (1974)	Oaxaca: Río Molino, San Miguel Suchixtepec	San Miguel Suchixtepec y Llano de Guadalupe, Oaxaca
<i>P. charadricola</i>	Duellman (1964)	Puebla: Río Totolapa, Huachinango	Huachinango, Puebla. Molango y Tlanchinol, Hidalgo
<i>P. chryses</i>	Adler (1965)	Guerrero: Entre Puerto Chico y el Asoleadero	Carrizal de Bravo y Puerto de Gallo, Guerrero
<i>P. crassa</i>	Brocchi (1877)	Oaxaca: Cerro San Felipe, Sierra de Juárez	Cerro San Felipe en Sierra de Juárez y La Cofradía en San Pedro el Alto, Zimatlán, Oaxaca
<i>P. cyanomma</i>	Caldwell (1974)	Oaxaca: Cerro Pelón, Sierra de Juárez	Localidad tipo
<i>P. cyclada</i>	Campbell y Duellman (2000)	Oaxaca: Vista Hermosa, Sierra de Juárez	Sierra de Juárez y Sierra Mixe, Oaxaca
<i>P. ephemera</i>	Meik <i>et al.</i> (2005)	Oaxaca: Entre Santa María Guienagati y Lachidola	Localidad tipo
<i>P. hazelae</i>	Taylor (1940)	Oaxaca: Cerro San Felipe, Sierra de Juárez	Sierra de Juárez, Oaxaca
<i>P. labedactyla</i>	Mendelson y Toal (1996)	Oaxaca: San Vicente Laxichio	Localidad tipo

<i>P. miahuatlanensis</i>	Meik <i>et al.</i> (2006)	Oaxaca: Candelaria Loxicha	Localidad tipo
<i>P. mykter</i>	Adler y Dennis (1972)	Guerrero: Puerto de Gallo	Carrizal de Bravo, Puerto de Gallo y El Tejocote, Guerrero
<i>P. pachyderma</i>	<i>H. pachyderma</i> (Taylor, 1942)	Puebla-Veracruz: Pan de Olla, Tezuitlán	Localidad tipo
<i>P. pentheter</i>	Adler (1965)	Oaxaca: San Gabriel Mixtepec	Sierra Madre del Sur, Guerrero y Oaxaca.
<i>P. psarosema</i>	Campbell y Duellman (2000)	Oaxaca: Totontepec	Localidad tipo
<i>P. robertsorum</i>	Taylor, 1940),	Hidalgo: Parque Nacional El Chico	Parque Nacional El Chico y Zacualtipan, Hidalgo.
<i>P. sabrina</i>	Caldwell (1974)	Oaxaca: Vista Hermosa, Sierra de Juárez	Localidad tipo
<i>P. siopela</i>	Duellman (1968)	Veracruz: Cofre de Perote	Localidad tipo
<i>P. thorectes</i>	(Adler, 1965)	Oaxaca: San Gabriel Mixtepec	Sierra Madre del Sur, Guerrero y Oaxaca.

En años recientes, los análisis de la familia Hylidae de Wiens *et al.* (2006), Smith *et al.* (2007), Wiens *et al.* (2010) (Fig. 4) y Pyron y Wiens (2011) (Fig. 5) incluyeron distintos números de especies del grupo *P. bistincta* (dos, siete, ocho y siete, respectivamente) y distintos números de marcadores (cuatro mitocondriales y seis nucleares en los primeros dos estudios y cinco mitocondriales y seis nucleares en los últimos dos). Todas las hipótesis resultantes presentaron valores altos de soporte para la monofilia del género *Plectrohyla* y del grupo *P. guatemalensis*, pero bajos para el grupo *P. bistincta*. Las relaciones entre las especies en cada estudio fueron similares, no se contradicen, y sólo los valores de probabilidad posterior fueron diferentes, los cuales fueron menores en el árbol de Pyron y Wiens (2011). Estas relaciones son difíciles de comparar con las de la filogenia morfológica de Duellman (2001) debido a que no incluyen las mismas especies, y únicamente son concordantes en el clado compuesto por las especies *P. pentheter* y *P. calthula*.

Los distintos trabajos sobre el grupo *P. bistrincta* o aquellos que lo incluyen dentro de la filogenia de la familia Hylidae concuerdan en que la monofilia del grupo aún no se ha puesto a prueba rigurosamente y que los resultados basados en datos moleculares siguen siendo hipótesis preliminares hasta que se incluyan las especies no consideradas en las filogenias moleculares previas, un número de muestras por especie que representen mejor su distribución geográfica y secuencias de los mismos genes para todas las muestras (Toal, 1994; Duellman y Campbell, 1992; Canseco-Márquez *et al.*, 2002, Meik *et al.*, 2005; Faivovich *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2005; Wiens *et al.*, 2010; Pyron y Wiens, 2011).

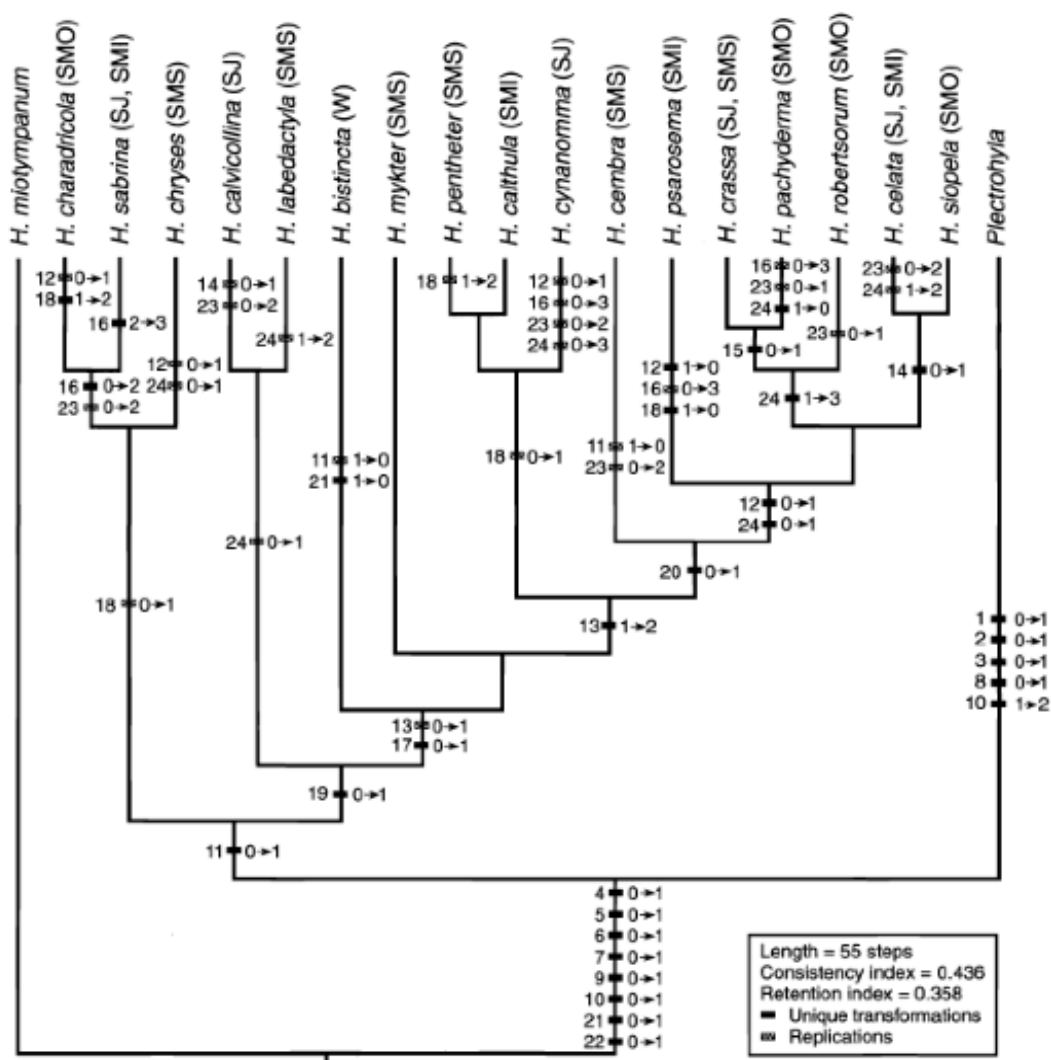


Figura 3. Filogenia del género *Plectrohyla* basada en caracteres morfológicos (Duellman, 2001).

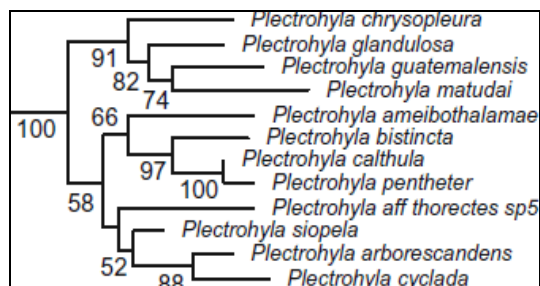


Figura 4. Filogenia molecular del género *Plectrohyla* (Wiens *et al.*, 2010)

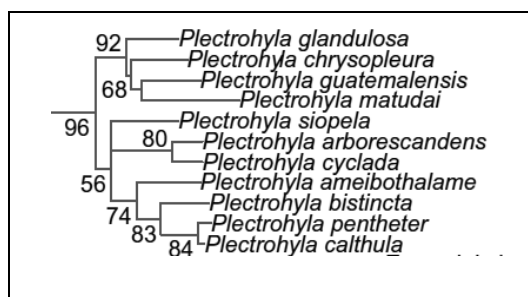


Figura 5. Filogenia molecular del género *Plectrohyla* (Pyron y Wiens, 2011).

En general, el estado de las poblaciones de las especies del grupo es preocupante. Algunas especies fueron descritas solo del ejemplar tipo y no existen datos sobre el estado actual de sus poblaciones, aunque se piensa que algunas se han extinguido. Esto, aunado a la fidelidad a los sitios de reproducción, los cuales se ven amenazados por la destrucción del hábitat y el calentamiento global, hace que estas especies sean difíciles de hallar. Muchos de sus registros son antiguos, como el caso de *P. pachyderma* (1942), y la mayoría se encuentra en peligro en la lista roja de la IUCN (Lips *et al.*, 2004; Frías *et al.*, 2008; Frías *et al.*, 2010). Por tanto, sólo mediante trabajo de campo intensivo y un análisis riguroso con especímenes y datos adicionales de los grupos *P. bistineta* y *P. guatemalensis* se podrá llegar a un mejor entendimiento de la evolución, delimitación de especies y sus relaciones dentro del grupo *P. bistineta*.

Objetivos

- Poner a prueba la hipótesis de la monofilia del grupo *P. bistrincta*.
- Obtener una filogenia del grupo con base en marcadores moleculares (secuencias de DNA) incluyendo el mayor número posible de sus especies.
- Obtener datos adicionales sobre la distribución y el estatus actual de sus especies.

Métodos

Muestreo de taxones

Las muestras de tejidos para el trabajo de laboratorio se obtuvieron de dos fuentes. Las muestras de nueve especies se obtuvieron de la colección de tejidos del Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y muestras de tres especies (*P. siopela*, *P. hazelae* y varias muestras de *P. bistrincta*) se obtuvieron de donaciones realizadas por las Universidades de Michigan y State University of New York (Stony Brook University). En el caso de las especies de las que no había muestras disponibles (13 especies), se realizaron 10 salidas al campo a sus localidades tipo y otras localidades donde se habían registrado. De esta manera, se recolectaron ejemplares de seis especies adicionales (Cuadro 2). Siete especies de las 24 que conforman al grupo *P. bistrincta* (*P. calvicollina*, *P. celata*, *P. charadricola*, *P. cyanomma*, *P. labedactyla*, *P. pachyderma* y *P. sabrina*) no se incluyeron en el estudio porque no se encontraron ejemplares de las mismas para la obtención de tejido.

Cuadro 2. Número de salidas por localidad y especies buscadas en cada localidad. Especies colectadas en negritas.

Salidas	Localidad	Especies
3	Sierra de Juárez, Oax	<i>P. calvicollina</i> , <i>P. celata</i> , <i>P. crassa</i> , <i>P. cyanomma</i> , <i>P. sabrina</i>
1	San Miguel Suchixtepec, Oax	<i>P. cembra</i>
1	Huauchinango, Pue	<i>P. charadricola</i>
1	San Vicente Laxichio, Oax	<i>P. labedactyla</i>

1	Carrizal de Bravo y El Tejocote, Gro	<i>P. mykter</i> , <i>P. chryses</i>
1	Tezuitlán, Ver	<i>P. pachyderma</i>
1	Totontepec, Oax	<i>P. psarosema</i>
1	Zoquizoquipan, Hgo	<i>P. robertsorum</i>

Datos

El análisis filogenético incluyó 178 secuencias de cinco fragmentos genéticos: aproximadamente 1379 y 904 pb de los genes mitocondriales ND1 y 12S, así como 428, 316, y 572 pb de los genes nucleares Rag-1, Rhod, y POMc. Estas secuencias corresponden a 65 individuos pertenecientes a 17 especies del grupo *P. bistincta*. Primero se obtuvieron las secuencias del gen mitocondrial ND1 y se realizó un análisis filogenético preliminar de las mismas. Posteriormente, se eligieron representantes de los clados en el árbol mitocondrial para obtener secuencias del resto de los genes.

Del total de secuencias, 155 fueron generadas por la presente autora (57, 28, 39, 27 y 27 correspondientes a los genes ND1, 12S, Rag-1, Rhod, y POMc, de 17, 14, 15, 12 y 15 especies, respectivamente), mientras que otras 23 se obtuvieron de Genbank (correspondientes a los genes ND1, 12S, Rag-1, Rhod, y POMc, de tres, siete, cinco, cinco y dos especies, respectivamente) (Anexo 1). Del total de individuos incluidos, 24 cuentan con secuencias de un gen, cinco individuos con secuencias de dos genes y 12 individuos con secuencias de tres, cuatro y cinco genes, respectivamente. El número mínimo de individuos por especie fue de uno y el máximo de 27 en el caso de la especie *P. bistincta*. El promedio de individuos incluidos por especie fue de cuatro.

Como grupos externos al grupo *P. bistincta* se utilizaron cuatro especies pertenecientes a su grupo hermano *P. guatemalensis* y siete del género *Exerodonta*, el cual es el género hermano de *Plectrohyla* (Faivovich, 2005). Los árboles se enraizaron con una especie del grupo *H. miotypanum* debido a que este grupo se considera polifilético y algunas especies previamente incluidas en él se han transferido recientemente al género *Plectrohyla* (Anexo 1) (Faivovich *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2005; Pyron y Wiens, 2011).

Protocolo de Laboratorio

La extracción de DNA se realizó a partir de un fragmento de hígado o músculo mediante el método de acetato de amonio (Fetzner, 1999). La amplificación de los distintos fragmentos de DNA mitocondrial y nuclear se realizó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Saiki *et al.*, 1988). Los oligonucleótidos utilizados para las amplificaciones de los fragmentos genéticos examinados fueron los diseñados previamente para la familia Ranidae (Bossuyt and Milinkovitch, 2000) y para la familia Hylidae; (Smith *et al.*, 2005; Wiens *et al.*, 2005), excepto por los oligonucleótidos R4, F1 y ND1Rv, los cuales se diseñaron para el presente estudio (Cuadro 3). El gen ND1 fue amplificado en dos fragmentos: el primero con los oligonucleótidos 16 y R4 y el segundo con los oligonucleótidos F1 y Tmet, mientras que el gen POMc se amplificó con tres combinaciones distintas de cuatro oligonucleótidos: 1F/4R, 3F/4R y 1F/2R. La concentración y el volumen utilizados para cada reactivo y el perfil de temperaturas de la PCR para cada gen se especifican en los cuadros 4 y 5, respectivamente. Los productos de PCR se purificaron mediante el método de precipitación con polietilenglicol (PEG-NaCl) (Lis y Schleif, 1975). En las reacciones en las que amplificó más de un fragmento, el fragmento seleccionado se purificó con el kit de extracción de QIAGEN (QIAquick Gel Extraction Kit®).

Los productos de PCR purificados se utilizaron como base para la reacción de secuenciación con el kit de secuenciación BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems ®) en 10 µl de volumen total. Para la lectura de los fragmentos de 12S y Rag-1 se usaron ambos oligonucleótidos; para el gen ND1 se utilizaron los oligonucleótidos internos ND1 Rv y F1, y para el gen POMc las respectivas combinaciones de los oligonucleótidos utilizadas para la amplificación. El producto resultante de la reacción de secuenciación se purificó con columnas de Sephadex, Separation Pharmacia Dextran (GE Healthcare Life Sciences ®). La secuenciación se llevó a cabo en un secuenciador automático de capilar modelo ABI PRISM 3100 genetic Analyser (Applied Biosystem®) del instituto de Biología de la UNAM.

Cuadro 3. Oligonucleótidos utilizados en la amplificación de cada gen por medio de PCR.

Primer	Secuencia	Estudio
16S	TTACCCTRGGGATAACAGCGCAA	Wiens <i>et al.</i> , (2005)
R4	GARACAAAYCGAGCACCATTYGA	Este estudio
ND1 Rv	GTGTWACATTGAAGTTTTGRAGTGTRAACC	Este estudio
F1	CTAGCCATAATCATCTGAACCCC	Este estudio
Tmet	AAGCTTTTGGGCCCATACCCCAA	Wiens <i>et al.</i> , (2005)
12S Fw t-Phe	ATAGCRCTGAARAYGCTRAGATG	Smith <i>et al.</i> , (2005)
12S Rv t-Val	CTCGGTGTAAGCGAGAGGC	Wiens <i>et al.</i> , (2005)
R1-GFF	GAGAAGTCTACAAAAAVGGCAAAG	Bossuyt y Milinkovitch (2000)
R1-GFR	GAAGCGCCTGAACAGTTTATTAC	Bossuyt y Milinkovitch (2000)
Rhod 1A	ACCATGAACGGAACAGAAGGYCC	Bossuyt y Milinkovitch (2000)
Rhod 1C	CCAAGGGTAGCGAAGAARCCCTC	Bossuyt y Milinkovitch (2000)
POMC-1 (F)	GAATGTATYAAAGMMTGCAAGATGGWCCT	Wiens <i>et al.</i> , (2005)
POMC-2 (R)	TAYTGRCCCTTYTTGTGGGCRTT	Wiens <i>et al.</i> , (2005)
POMC-4 (R)	TGGCATTYTTGAAAAGAGTCAT	Wiens <i>et al.</i> , (2005)
POMC-3 (F)	TCTGCMGARTCWCCYGTGTTTCC	Wiens <i>et al.</i> , (2005)

Cuadro 4. Concentraciones (mM) y volumen en (µl) utilizados para cada reactivo en la PCR de cada gen

Reactivos	Concentración	ND1/12s	Rag-1/Rhod/ POMc
Agua destilada	-	18.3	18.6
Buffer	10	2.5	2.5
MgCl ₂	25	1.5	1.2
dNTP's	10	1	0.5
Primer	10	0.5	0.5
Taq polimerasa	-	0.2	0.2
DNA genómico	-	1	1
Volumen total		25	24.5

Cuadro 5. Perfil de temperaturas de PCR para cada gen. T = temperatura; min = minutos.

Gen	ND1/ 12S		Rag-1/ Rhod		POMc	
	T (°C)	min	T (°C)	min	T (°C)	min
1. Desnaturalización Inicial	94°	5:00	94°	2:00	96°	1:00
2. Desnaturalización	94°	0:30	94°	0:45	95°	0:30
3. Alineación	56°/54°	0:30	59°/57°	0:45	58°	0:30
4. Extensión	72°	1:15	72°	1:30	72°	1:00
5. Extensión final	72°	5:00	72°	10:00	72°	10:00
Ciclos (pasos 2--4)	40					

Análisis de datos

Las secuencias de cada uno de los cinco genes se editaron en el programa Staden Package versión 2.0.0 (Bonfield *et al.*, 1995) y se alinearon en los programas McClade versión 4.08a (Maddison y Maddison, 2005) y Muscle versión 3.8.31 (Edgar, 2004). En el caso de los genes codificantes (ND1, Rag-1, Rhod, POMc), las matrices de nucleótidos se transformaron a proteínas en el programa Mesquite versión 2.75 (Maddison y Maddison, 2007), para así poder llevar a cabo la correcta ubicación correcta de la posición de los codones y verificar que las secuencias no incluyeran codones de paro que indicaran la secuenciación de pseudogenes. Una vez determinados los sitios de los codones, se construyeron matrices de datos para cada posición de codón por separado de cada uno de los genes codificantes mediante el programa Mega versión 5 (Tamura *et al.*, 2011).

Se utilizó el programa jModelTest v.2.1.1 (Posada, 2008) para encontrar el modelo de sustitución de nucleotídica que mejor se ajustara a cada partición de los datos; es decir, para cada posición de codón en el caso de los genes que codifican proteína y para el gen no codificante 12S. Los modelos de sustitución nucleotídica para cada partición se muestran en el cuadro 6 y se seleccionaron con base en el criterio de información Akaike (AIC), el cual toma en cuenta el número de parámetros, provee una medida de ajuste datos-modelos, e incluye una penalización para la sobreparametrización (Posada y Buckley, 2004; Sullivan y Joyce, 2005).

Posteriormente, se realizaron análisis filogenéticos utilizando el método de inferencia Bayesiana con el programa MRBAYES v. 3.1.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003). Se realizaron análisis para cada gen individualmente para corroborar que no existieran conflictos fuertemente apoyados entre las relaciones obtenidas, que indicaran una discordancia entre las historias de los genes (Wiens, 1998; Wiens *et al.*, 2010b). Al no encontrarse conflictos entre las hipótesis, se realizaron tres análisis concatenados: el

primero para los dos genes mitocondriales (ND1 y 12S), el segundo para los tres genes nucleares (Rag-1, Rhod, POMc) y el tercero para los cinco genes.

Para cada matriz de datos (para cada gen y concatenados), se llevaron a cabo dos análisis simultáneos usando diez millones de generaciones cada uno. El muestreo de los árboles se realizó cada 1000 generaciones. El porcentaje de árboles eliminados (*burn-in*) fue de 25 y se determinó una vez que se estabilizaron los valores de likelihood (Nylander *et al.*, 2004). Los árboles restantes fueron utilizados para realizar un consenso de mayoría. Para determinar el soporte de las ramas se consideró la frecuencia con que aparecen los clados en el conjunto de árboles como su probabilidad posterior (Larget y Simon, 1999), en donde clados con valores de probabilidad posterior mayores que 95% fueron considerados como clados fuertemente apoyados (Huelsenbeck y Ranala, 2004).

Una vez generadas las hipótesis filogenéticas, el método empleado para delimitar las especies fue el propuesto para filogenias de haplotipos de DNA mitocondrial por Wiens y Penkrot (2002), el cual asume que si los haplotipos de una localidad no se reúnen en un clado o existe discordancia con la distribución geográfica, se considera evidencia de flujo génico potencial entre las poblaciones, y por lo tanto, el método sugiere la presencia de un solo linaje.

Análisis de hipótesis alternativas

Este análisis fue realizado para probar si las siguientes hipótesis propuestas por Duellman (2001) con base en caracteres morfológicos [(1) *P. crassa*-*P. robertsorum* (2) *P. crassa*-*P. robertsorum*, *P. celata*-*P. siopela* (3) *P. crassa*-*P. robertsorum*, *P. celata*-*P. siopela* y *P. cembra* (4) *P. crassa*-*P. robertsorum*, *P. celata*-*P. siopela*, *P. cembra*, *P. pehtheter* y *P. calthula*], no están presentes en las topologías alternativas del presente análisis, las cuales no encontraron en el árbol de consenso que resultó del análisis bayesiano. El análisis de hipótesis alternativas se realizó en el programa Mesquite versión 2.75 (Maddison y Maddison, 2007), el archivo que fue utilizado incluyó el set creíble de árboles posterior al burn in (25%) y se obtuvo el número de árboles en los

que se recuperó cada una de las cuatro hipótesis. Se considero una hipótesis filogenética estadísticamente rechazada cuando dicha hipótesis estaba ausente en el set creible de árboles.

Cuadro 6. Modelo de sustitución de bases utilizado para cada partición.

Partición	Modelo AIC
ND1_ Posición 1	SYM+I+G
ND1_ Posición 2	TPM1uf+I+G
ND1_ Posición 3	TIM2+I+G
ND1_tRNA	TIM2+G
12s	GTR+G
Rag-1_ Posición 1	K80+G
Rag-1_ Posición 2	TPM2uf+I
Rag-1_ Posición 3	TIM2ef+I
Rhod_ Posición 1	JC
Rhod_ Posición 2	F81+I+G
Rhod_ Posición 3	TIM3ef+G
POMc_ Posición 1	HKY+I
POMc_ Posición 2	TIM3+G
POMc_ Posición 3	HKY+G

Revisión de morfología de ejemplares

Los objetivos de la revisión morfológica fueron: (1) verificar la validez de las 24 especies del grupo mediante la revisión de sus series tipo y otros ejemplares en colecciones asignados a las mismas, (2) determinar confiablemente los ejemplares recolectados durante el trabajo de campo, (3) corroborar la determinación correcta de los *vouchers* a partir de los cuales se obtuvieron las secuencias de los marcadores moleculares, y (4) esclarecer la confusión respecto a la validez de algunos caracteres utilizados en la descripción y diagnosis de las especies. Para la revisión morfológica, se tomaron en cuenta 38 caracteres, los cuales han sido utilizados ampliamente en la diagnosis de las especies que conforman al grupo *P. bistrincta*. Los caracteres utilizados se enlistan a continuación con una breve descripción de los mismos.

1. Forma del hocico en vista dorsal
2. Forma del hocico en vista lateral
3. Textura de la piel del dorso
4. Textura de la piel de la garganta y del vientre
5. Coloración del dorso
6. Coloración del vientre
7. Coloración de los costados
8. Coloración de los muslos
9. Presencia-ausencia de una línea blanca en el labio superior
10. Presencia-ausencia de una línea blanca lateral de la axila a la ingle
11. Presencia-ausencia de una línea cantal blanca
12. Tamaño de la membrana palmar
13. Tamaño de la membrana plantar
14. Tamaño de la membrana cloacal
15. Área de exposición del tímpano fuera del pliegue supratimpánico
16. Presencia-ausencia de anillo timpánico
17. Presencia-ausencia y forma del pliegue supratimpánico
18. Diámetro del tímpano
19. Diámetro del ojo
20. Presencia-ausencia de quilla rostral
21. Presencia-ausencia de membrana axilar
22. Presencia-ausencia de pliegue tarsal
23. Presencia-ausencia de pliegue en la muñeca
24. Presencia-ausencia de pliegue torácico
25. Presencia-ausencia y posición de hendiduras bucales
26. Presencia-ausencia de excrecencias nupciales
27. Complejión del cuerpo
28. Presencia-ausencia de tubérculos en el borde ventrolateral del antebrazo
29. Longitud total del tercer dedo de la mano
30. Distancia del carpo a la base del disco del tercer dedo de la mano
31. Longitud total del tercer dedo del pie
32. Longitud del tarso a la base del disco del tercer dedo del pie
33. Longitud hocico-cloaca
34. Longitud de la tibia
35. Diámetro del disco del tercer dedo de la mano
36. Diámetro del disco del tercer dedo del pie

Resultados

Datos moleculares

El análisis filogenético incluyó 178 secuencias pertenecientes a cinco genes: dos genes mitocondriales (ND1 1379 pb y 12S 904 pb) y tres genes nucleares (Rag-1 428 pb, Rhod 316 pb, y POMc 572 pb), que corresponden a 65 individuos de 17 especies del grupo *P. bistincta*. Las matrices concatenadas de los genes mitocondriales, nucleares y de los cinco genes incluyeron 2283 pb, 1316 pb, y 3599 pb respectivamente. En el caso de los genes codificantes de proteína, una vez traducidos se observó que únicamente presentaban codones de paro al final, es decir no se trataba de pseudogenes y la alineación y posición de codones fue la correcta.

La alineación de los genes fue realizada sin ambigüedad, a excepción de un fragmento que incluyó al gen ND1 y un fragmento de tRNA en cada extremo. El total de pares de bases obtenidas para este fragmento fue de 1402. Sin embargo, debido a que durante el alineamiento se eliminaron 23 regiones ambiguas de las 1043 pares de bases que originalmente constituían al gen ND1, la longitud total del fragmento se redujo a 1379 pb. De estas, las primeras 312pb corresponden al primer tRNA, de la posición 313 a la 1332 (1020pb) corresponden al gen ND1, y de la posición 1333 a la 1379 (47pb) corresponden al segundo tRNA.

Relaciones filogenéticas

Se generaron ocho hipótesis filogenéticas: una a partir de las secuencias de cada gen (Figuras 6-7), y una a partir de las secuencias concatenadas de los genes mitocondriales, los genes nucleares, y los genes mitocondriales y nucleares (Figuras 8, 9 y 10, respectivamente). En general, los árboles de los genes nucleares presentaron un mayor número de relaciones no resueltas (politomías) y valores de probabilidad posterior bajos. Hubo pocas incongruencias entre los árboles de los genes individuales, o entre los árboles de las secuencias concatenadas de los genes mitocondriales y nucleares. Además, en todos

los casos de incongruencia entre dos árboles, las relaciones que difirieron estuvieron fuertemente apoyadas en uno de los árboles pero no en el otro, o estuvieron débilmente apoyadas en los dos, de manera que en ningún caso hubo relaciones incongruentes fuertemente apoyadas en cada árbol. Por tanto, las incongruencias encontradas no se consideran reales. Como por ejemplo, la relación propuesta con base en el gen 12s entre las especies *P. robertsorum* y *P. celata* (con un valor de soporte bajo), no se mantiene en el resto de las hipótesis. Por el contrario, la especie *P. celata* se ubica con las especies *P. cyclada*, *P. arborescandens* y *P. siopela* (con un valor de soporte alto) en la hipótesis construida a partir del gen ND1, en el árbol concatenado de los genes mitocondriales y de los cinco genes. Por otra parte, la inexistencia de incongruencias fuertemente apoyadas entre los distintos árboles y el hecho de que la mayoría de los individuos carecieron de datos de uno o más genes apoya la pertinencia de los análisis de secuencias concatenadas de los distintos genes.

La hipótesis obtenida a partir del análisis de las secuencias concatenadas de todos los genes fue la más inclusiva y resuelta (Fig. 10). En esta hipótesis, la monofilia de *Plectrohyla*, así como la de los grupos *P. bistincta* y *P. guatemalensis*, se encuentra bien apoyada. El grupo *P. bistincta* incluye 17 de las 24 especies del grupo. La topología del árbol dentro del grupo *Plectrohyla bistincta* es asimétrica y puede describirse como una serie de 10 linajes que se ramifican sucesivamente desde la base hacia las puntas del árbol (nodos 1--9).

El primer linaje conduce a un clado fuertemente apoyado que contiene las secuencias de *P. hazelae* y *P. thorectes*. Sin embargo, las secuencias de *P. thorectes* no forman un grupo monofilético. Las secuencias de *P. hazelae* forman un subclado fuertemente apoyado que se agrupa con la secuencia de *P. thorectes* de Oaxaca, aunque este grupo no está apoyado fuertemente, y todas estas secuencias forman el grupo hermano de la secuencia de *P. thorectes* de Guerrero.

El segundo linaje corresponde a *P. robertsorum*, el cual es seguido por un tercer linaje que conduce a un clado apoyado fuertemente con varias especies. Las secuencias de

P. cembra y *P. miahuatlanensis* forman un subclado fuertemente apoyado que se agrupa con las secuencias de la población de *Plectrohyla* de status incierto de Malinaltepec, Guerrero, aunque este grupo no está fuertemente apoyado, y todas estas secuencias forman el grupo hermano de la secuencia de *P. crassa*.

El cuarto linaje conduce a un clado apoyado débilmente que contiene las secuencias de cuatro especies agrupadas en dos subclados. Un subclado está débilmente apoyado e incluye a las secuencias de *P. celata* y *P. siopela*. El otro subclado está fuertemente apoyado y comprende las secuencias de *P. cyclada* y *P. arborescandens*. Sin embargo, estas secuencias no forman clados separados, sino que se encuentran entremezcladas independientemente de la especie y localidad a la que correspondan.

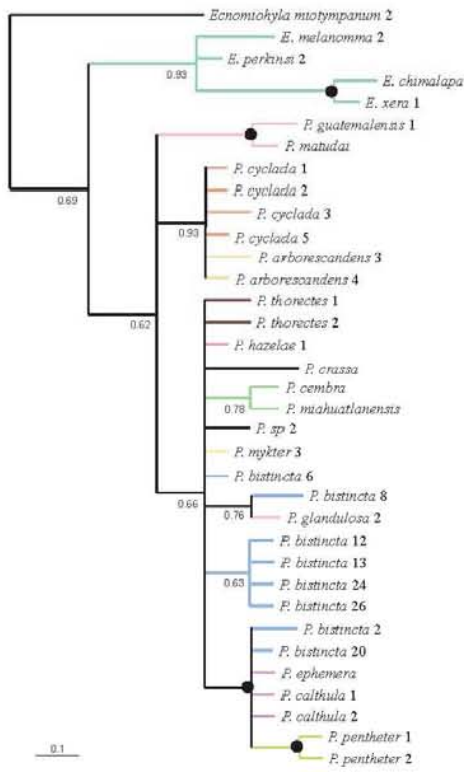
Los linajes quinto a décimo hacia las puntas del árbol conducen a varios clados fuertemente apoyados. El quinto linaje está compuesto por las secuencias de *P. ameibothalame*; el sexto contiene un subclado fuertemente apoyado con las secuencias de *P. mykter* formando el grupo hermano de *P. chryses*; el séptimo está compuesto por las secuencias de *P. bistincta* de Jalisco y Michoacán; el octavo comprende las secuencias de *P. bistincta* de Puebla, Veracruz y Oaxaca; el noveno contiene las secuencias de *P. bistincta* de Guerrero y el oeste de Oaxaca; y el décimo está compuesto por las secuencias de tres especies agrupadas en dos subclados fuertemente apoyados. Un subclado contiene a las secuencias de *P. pentheter*, y el otro contiene a la secuencias de *P. calthula* y a la secuencia de *P. ephemera* anidada entre ellas.

Finalmente, los valores de soporte se incrementaron gradualmente desde la raíz del árbol hacia sus puntas. Los grupos hermanos de los linajes primero, segundo y tercero, estuvieron débilmente apoyados, mientras que los grupos hermanos de los linajes cuarto, quinto y sexto estuvieron débilmente apoyados pero sólo marginalmente (valores de probabilidad posterior 0.92--0.94), y los grupos hermanos de los linajes séptimo, octavo y noveno estuvieron fuertemente apoyados.

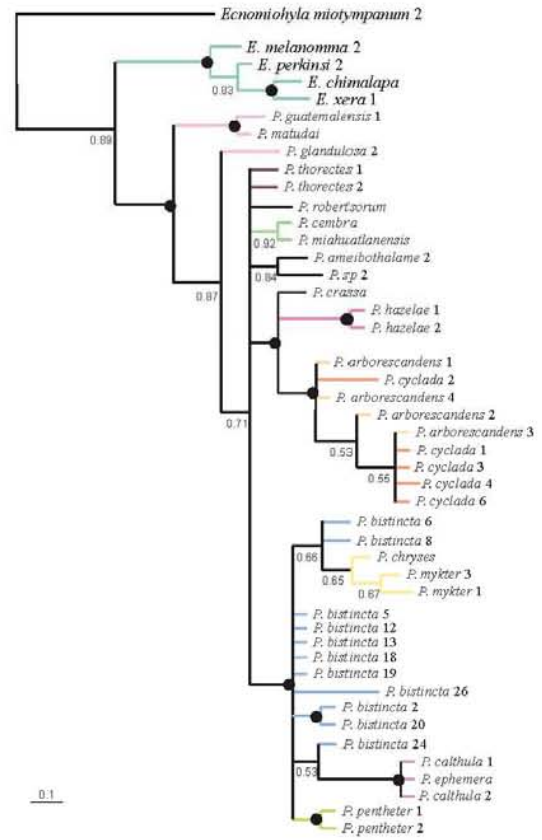
Figura 6. Filogramas bayesianos obtenidos a partir de las secuencias de los genes nucleares Rhodopsina, Rag-1 y POMc. Los números sobre las ramas son valores de probabilidad posterior. Los círculos oscuros sobre los nodos representan valores de probabilidad posterior >0.95 . Los números asignados a cada especie corresponden al Anexo 3.

Figura 7. Filograma bayesiano obtenidos a partir de las secuencias de los genes mitocondriales 12s, ND1 y tRNAs adyacentes. Los números sobre las ramas son valores de probabilidad posterior. Los círculos oscuros sobre los nodos representan valores de probabilidad posterior >0.95 . Los números asignados a cada especie corresponden al Anexo 3.

Rhodopsina



Rag-1



POMc

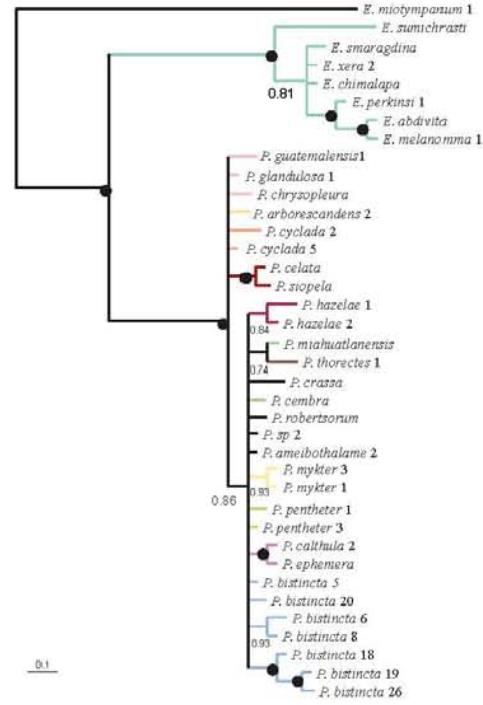


Figura 6.

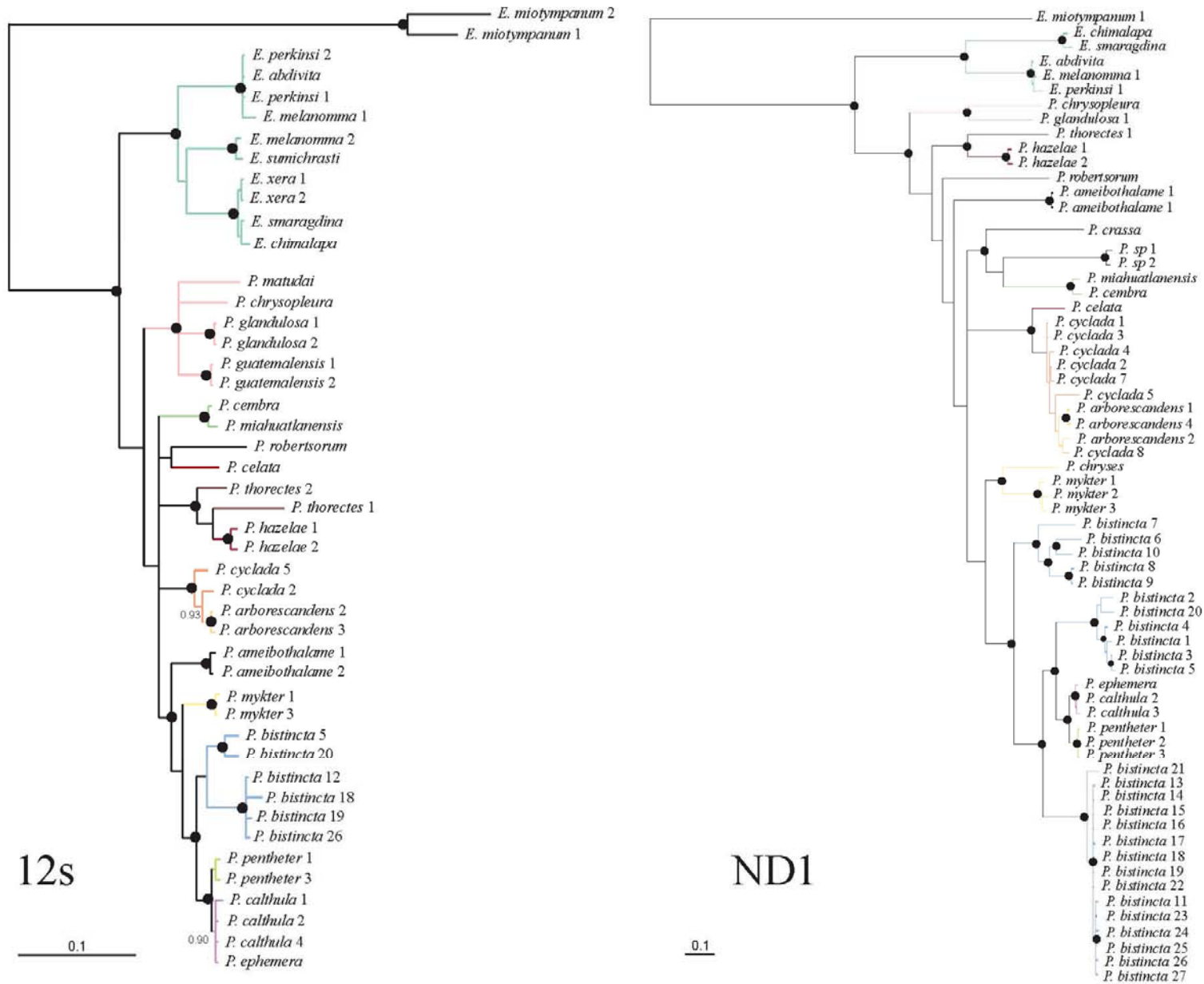


Figura 7.

Figura 8. Filograma bayesiano obtenidos a partir de las secuencias concatenadas de los dos genes mitocondriales 12s, ND1 y tRNAs adyacentes. Los números sobre las ramas son valores de probabilidad posterior. Los círculos oscuros sobre los nodos representan valores de probabilidad posterior >0.95. Los números asignados a cada especie corresponden al Anexo 3.

Figura 9. Filograma bayesiano obtenidos a partir de las secuencias concatenadas de los dos genes nucleares Rag-1, Rhod y POMc. Los números sobre las ramas son valores de probabilidad posterior. Los círculos oscuros sobre los nodos representan valores de probabilidad posterior >0.95. Los números asignados a cada especie corresponden al Anexo 3.

Figura 10. Filograma bayesiano obtenidos a partir de las secuencias concatenadas de los cinco genes (ND1 y tRNAs adyacentes, 12s, Rag-1, Rhod y POMc). Los círculos oscuros sobre los nodos representan valores de probabilidad posterior >0.95. Los números asignados a cada especie corresponden al Anexo 3. Los linajes mencionados en el texto fueron identificados con una línea vertical y su número correspondiente en la parte inferior (nodos 1--9). Las letras sobre las ramas representan: **a** género *Plectrohyla*, **b** grupo *P. guatemalensis* y **c** grupo *P. bistincta*.

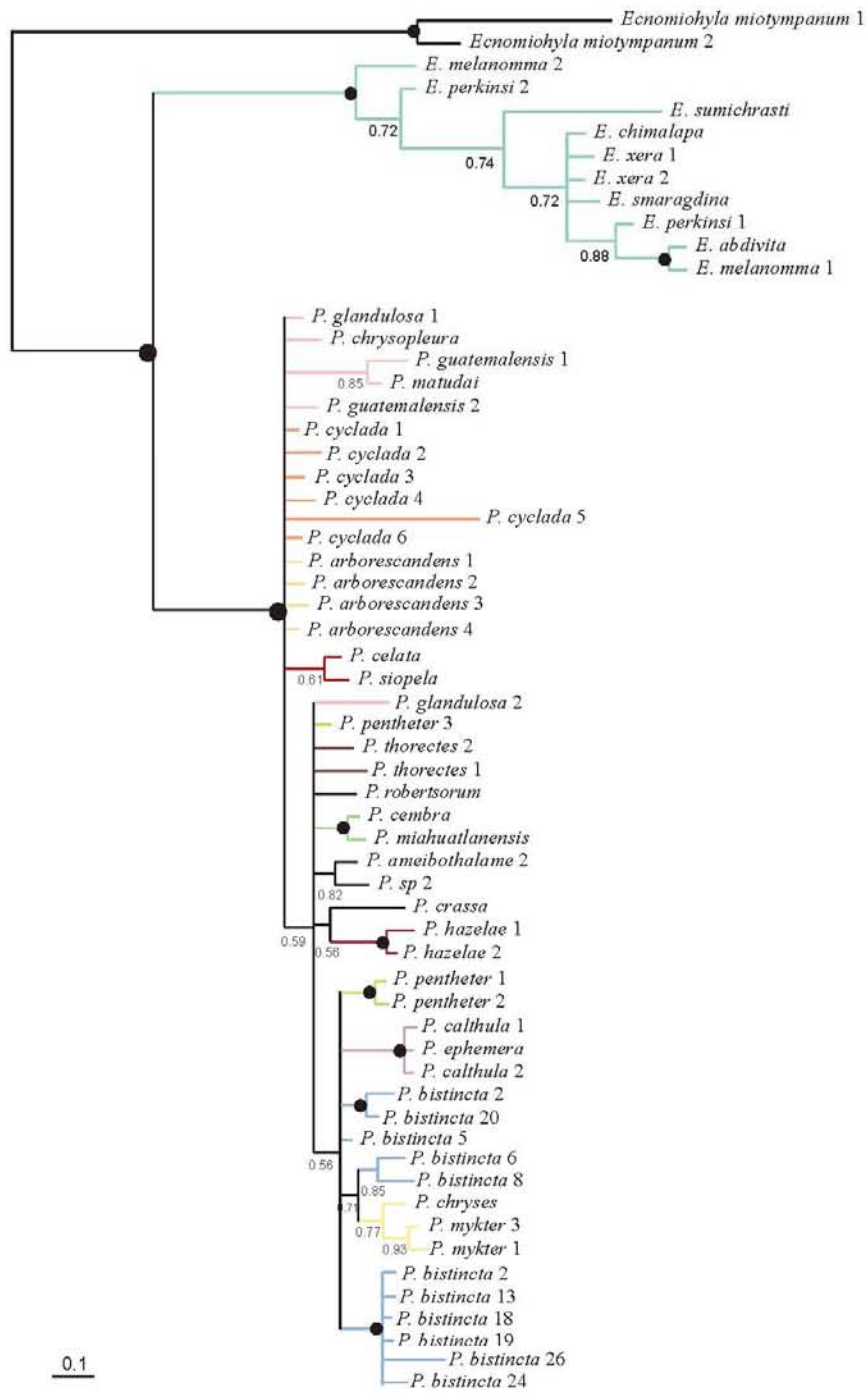


Figura 8.

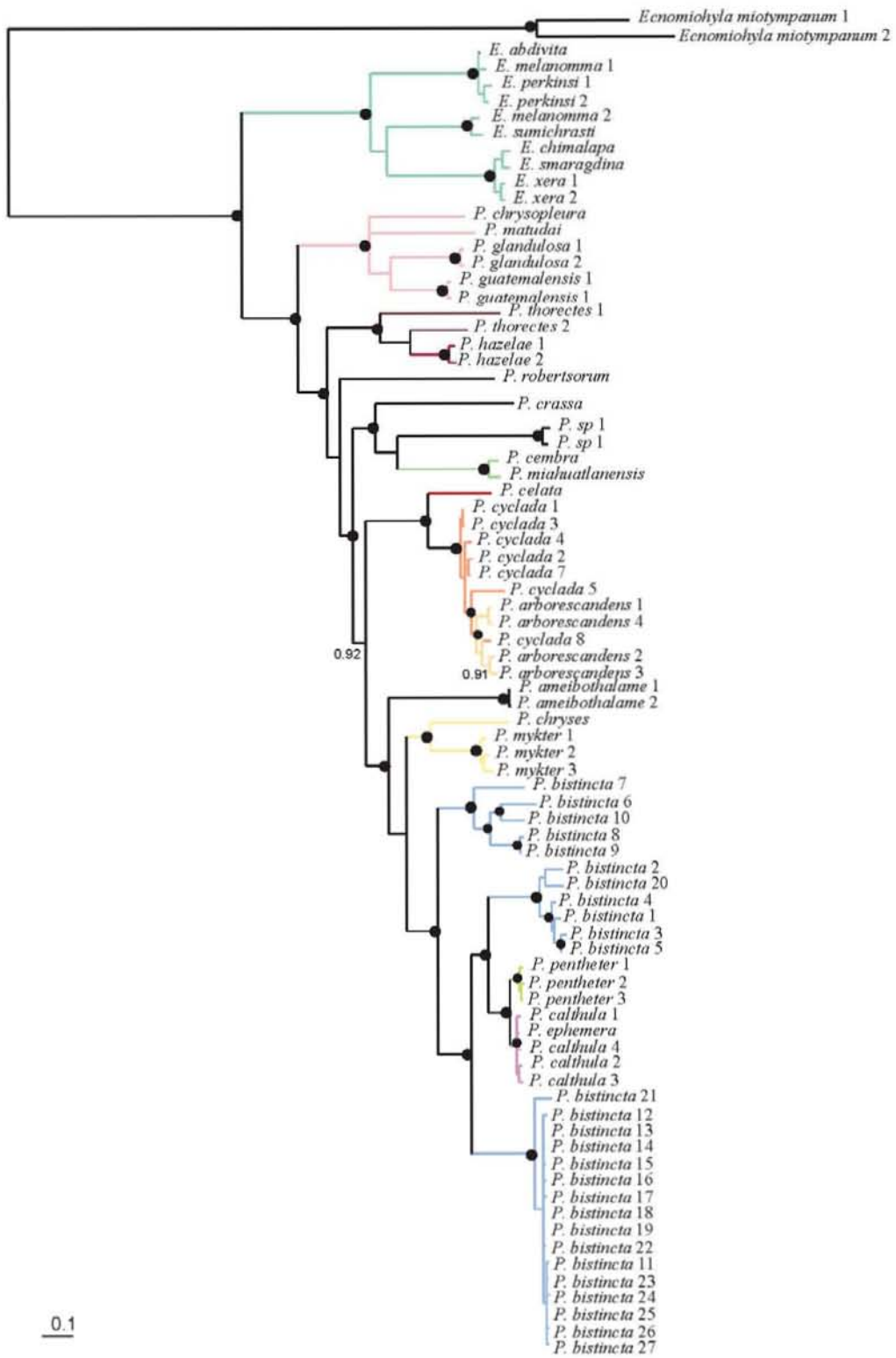


Figura 9.

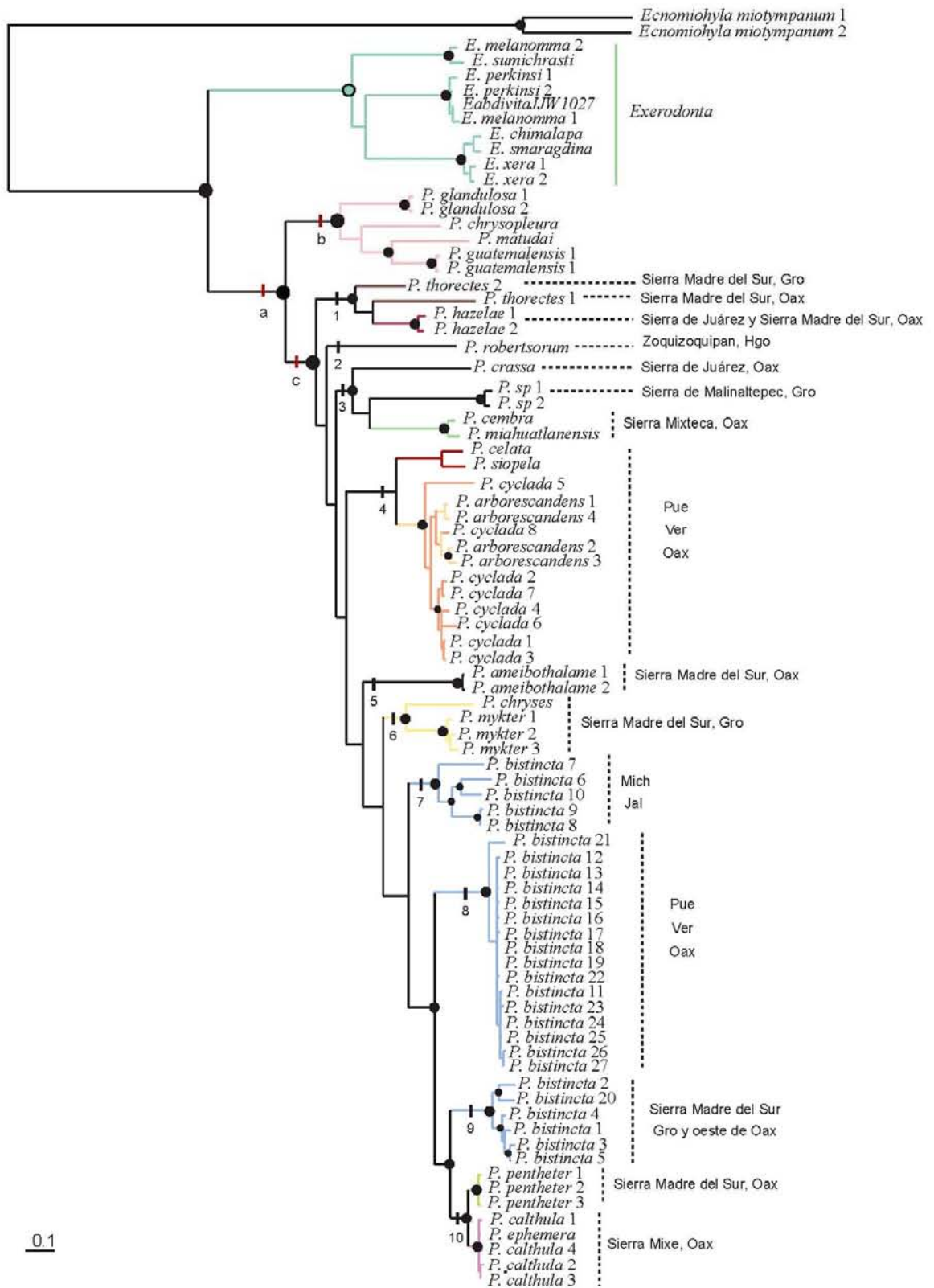


Figura 10.

Análisis de hipótesis alternativas

En este análisis se comprobó que las siguientes hipótesis previamente sugeridas (Duellman, 2001) fueron estadísticamente rechazadas ya que no se encontraron en el set creíble de árboles: (1) *P. crassa*-*P. robertsororum*, *P. celata*-*P. siopela* y *P. cembra*, (2) *P. crassa*-*P. robertsororum*, *P. celata*-*P. siopela*, *P. cembra*, *P. pehtheter* y *P. calthula*. Por el contrario, las siguientes hipótesis se recuperaron en 17432 y en 34 árboles respectivamente: (1) *P. crassa*-*P. robertsororum* (2) *P. crassa*-*P. robertsororum*, *P. celata*-*P. siopela*, por lo cual estas no se pueden rechazar estadísticamente.

Revisión morfológica

Se examinaron un total de 527 ejemplares correspondientes a las 24 especies que conforman al grupo *P. bistincta*, incluyendo a los ejemplares tipo y a las series tipo de cada una. Los resultados de esta revisión nos permitieron corroborar la validez de las especies que contaban únicamente con el ejemplar tipo, por una combinación de caracteres que las diagnostican del resto (*P. miahuatlanensis*, *P. psarosema*, *P. pachyderma*, y *P. labedactyla*). En el caso de *P. calvicollina* queda en duda la validez de esta especie ya que solo cuenta con el ejemplar tipo y el único carácter que la diferencia del resto es la forma concava del hocico en vista lateral, el resto de los caracteres son compartidos con *P. cyclada*; por lo cual podría tratarse de un ejemplar de esta especie con variación en este carácter. Sin embargo, no puede corroborarse hasta contar con un ejemplar con esta característica y su secuencia respectiva para incluir en el análisis.

También se pudo corroborar la validez de las especies que cuentan con una serie de pequeña de ejemplares tipo (*P. ameibothalame*, *P. calthula*, *P. cembra*, *P. celata*, *P. chryses*, *P. hazelae*, *P. thorectes* y *P. mykter*), y de aquellas especies que cuentan con series tipo, y además un número grande de ejemplares (*P. charadricola*, *P. crassa*, *P. cyanomma*, *P. robertsororum*, *P. sabrina*, *P. pentheter* y *P. arborescandens*). En el caso de las especies *P. ephemera* y *P. cyclada* se determinó que no se trata de especies válidas si no sinónimos de *P. calthula* y *P. arborescandens* respectivamente, con base en el holotipo de la primera

(ya que no cuenta con más ejemplares) y con una serie de ejemplares grande de la segunda. En el caso de la especie de ampla distribución *P. bistincta* se pudieron encontrar combinaciones de caracteres que diferencian a los tres caldos propuestos en la hipótesis molecular, los cuales se dicuten posteriormente.

Determinación de los especímenes de los tejidos donados

Plectrohyla siopela

Las hipótesis filogenéticas previas, ubican a las especies *P. celata* y *P. siopela* como especies hermanas (Duellman, 2001, Smith *et al.*, 2007; Pyron y Wiens, 2011). La revisión morfológica del presente estudio sugiere que se trata de una sola especie, con la misma distribución de *P. arborescandens*-*P. cyclada* (su especie hermana de acuerdo al presente análisis molecular. Sin embargo, la única secuencia de *P. siopela* se obtuvo de Genbank y corresponde al gen nuclear POMc, el cual presentó la menor resolución de todos los genes. Esta fue obtenida por Smith *et al.* (2007), a partir de un tejido donado sin examinar, ya que el espécimen se encuentra perdido.

Plectrohyla robertsorum

En el presente estudio sólo se pudo incluir un individuo de *P. robertsorum*. Los caracteres de este ejemplar concuerdan con los ejemplares previamente colectados en la zona de Zoquizoquipan, Hidalgo. Sin embargo, estos ejemplares presentan numerosas diferencias morfológicas con respecto a los individuos examinados de la localidad tipo (incluyendo a la serie tipo). De esta forma, para determinar si la población muestreada en este estudio es una especie distinta o la variación morfológica entre las muestras mencionadas es sólo variación entre poblaciones de la misma especie, sería necesario incluir muestras de la localidad tipo de *P. robertsorum* en el análisis de datos moleculares.

Notas sobre la distribución de las especies

Plectrohyla ameibothalame. Era conocida únicamente de la localidad tipo en los

alrededores de Yosocuno, San Pedro Nopala. En el presente estudio se registró a 3.3km al suroeste de San Cristóbal Suchixtlahuaca, aproximadamente 28 km en línea recta al suroeste de la localidad tipo.

Plectrohyla hazelae. Su distribución incluía varias localidades en la Sierra de Juárez en el noreste de Oaxaca (Duellman, 2001; Mendelson y Kabay, 2009; Heimes y Aguilar, 2011). En este estudio se encontró en San Vicente Laxichio en la Sierra Madre del Sur en Oaxaca, separada geográficamente de las anteriores poblaciones por aproximadamente 116 km y por los valles centrales de Oaxaca.

Discusión

1. Relaciones filogenéticas

La hipótesis filogenética del grupo *P. bistincta* obtenida en el presente estudio no corrobora ninguna de las hipótesis de relaciones entre sus especies basadas en datos morfológicos (Adler, 1965, Duellman, 1968, Adler y Dennis, 1972 y Caldwell 1974), excepto por el grupo propuesto por Caldwell (1974) que incluye a las especies *P. bistincta* y *P. pentheter*. La hipótesis obtenida discrepa de la hipótesis propuesta por Duellman (2001) en la mayoría de las relaciones interespecíficas (Fig. 3), y los únicos clados concordantes son los que agrupan a las especies *P. calthula* y *P. pentheter* y a las especies *P. celata* y *P. siopela*. Sin embargo el análisis de hipótesis alternativas indica que no se pueden rechazar significativamente dos de los clados de la hipótesis de Duellman (2001): el clado que incluyen a las especies *P. robertsorum*-*P. crassa*, relación que podría evaluarse al contar con una muestra de a localidad tipo de *P. robertsorum* (ver resultados: determinación de ejemplares) y el clado que incluye a las especies *P. crassa*-*P. robertsorum*, *P. celata*-*P. siopela*. Una comparación a detalle entre estas dos hipótesis es difícil, debido a que las especies incluidas en cada estudio son distintas. La filogenia de Duellman (2001) incluye las siete especies faltantes en el presente estudio y no incluye a las tres especies que se describieron y a las cuatro que se trasladaron posteriormente al grupo *P. bistincta*.

El presente estudio encontró las mismas relaciones entre las especies que se observan en las hipótesis filogenéticas más recientes (Wiens *et al.*, 2010 y Pyron y Wiens 2011) (Fig. 4 y 5), excepto que en el presente estudio se obtuvo un clado conformado por las especies *P. chryses*/*P. mykter* y se incluye *P. celata* en el clado de *P. arborescandens*/*P. cyclada*. Los valores de probabilidad posterior de los clados dentro del grupo *P. bistincta* son altos, a diferencia de los valores en el estudio anterior, y en el presente estudio la monofilia del grupo *P. bistincta*, así como las relaciones entre las especies *P. arborescandens*/*P. cyclada* y *P. bistincta*/*P. calthula*/*P. pentheter* estuvieron bien apoyadas.

Los clados de la presente hipótesis agrupan a los haplotipos por especie y por población con excepción de las especies *P. bistincta* y *P. thorectes*. Los valores de soporte bajos y las relaciones no resueltas se deben probablemente a la falta de caracteres informativos en esos niveles; es decir, a la falta de marcadores de tasas de evolución más bien lentas. A continuación se discuten las relaciones obtenidas en el presente estudio.

Clado *P. thorectes* y *P. hazelae*

Plectrohyla thorectes y *P. hazelae* son las especies más pequeñas dentro del grupo *bistincta*. Son simpátricas en la Sierra Madre del Sur de Oaxaca y su estrecha relación fue sugerida previamente por Duellman (2001), quien las agrupó en el grupo *Hyla hazelae*. La revisión morfológica del presente estudio sugiere el patrón de coloración del dorso como un carácter diagnóstico del grupo, ya que únicamente estas dos especies cuentan con puntos iridiscentes de color verde intenso.

La especie *P. thorectes* no se había incluido en las filogenias morfológicas ni moleculares previas. Dentro de la presente hipótesis, las secuencias correspondientes a las poblaciones de la Sierra Madre del Sur de Guerrero y Oaxaca no forman un grupo monofilético, a pesar de compartir los caracteres autapomórficos que distinguen a *P. thorectes* del resto de las especies del grupo *bistincta*, (la longitud hocico cloaca pequeña y la coloración del vientre con manchas y reticulaciones gruesas oscuras). Los caracteres

que distinguen a la población de Guerrero son (caracteres de la población de Oaxaca entre paréntesis): la forma de la cabeza en vista dorsal y ventral truncada (redondeada), pliegue tarsal ausente (presente), antifaz de color oscuro presente (ausente) y forma del cuerpo ligeramente robusta (esbelta). La evidencia sugiere que la población de Guerrero tal vez trate de una especie distinta. Sin embargo, se requiere un mayor número de ejemplares del estado de Guerrero para corroborar esta propuesta.

P. robertsorum

La especie *P. robertsorum* es basal con respecto al clado que incluye al resto de las especies incluidas en el análisis (*P. ameibothalame*, *P. cyclada*, *P. arborescandens*, *P. mykter*, *P. chryses*, *P. pentheter*, *P. calthula*, *P. ephemera*, *P. celata*, *P. siopela*, *P. crassa*, *P. sp.*, *P. miahualtanensis* y *P. cembra*). En varias ocasiones se ha propuesto una estrecha relación entre *P. robertsorum* y las especies *P. crassa* y *P. pachyderma* (Taylor, 1942; Adler y Dennis, 1972; Caldwell, 1974; Duellman, 2001), incluso en la prueba de hipótesis alternativas del presente estudio la relación entre *P. crassa* y *P. robertsorum* se recupera en 17,432 árboles, por lo que sigue siendo una posibilidad. Sin embargo, esta relación no se pudo corroborar debido a la incertidumbre sobre la identidad taxonómica del ejemplar de *P. robertsorum* empleado y a que el estudio no incluyó a *P. pachyderma*. Aunado a esto, la especie *Plectrohyla crassa* se anidó en el subclado que incluye a las especies *P. sp.*, *P. cembra* y *P. miahuatlanensis* y no con la especie *P. robertsorum*.

Clado *P. cembra*, *P. miahuatlanensis*, *P. sp.*, *P. crassa*

El clado que incluye a estas cuatro especies tiene un valor de soporte alto. Las especies *P. cembra*, *P. miahuatlanensis*, y *P. crassa* son simpátricas en la Sierra Madre del Sur de Oaxaca y la población de *Plectrohyla sp.* se distribuye en la Sierra Madre del Sur de Guerrero cerca del límite con Oaxaca. A pesar de que la especie *P. crassa* es más similar en morfología a las especies *P. robertsorum* y *P. pachyderma* y siempre se ha relacionado con ellas (Taylor, 1942; Adler y Dennis, 1972; Caldwell, 1974; Duellman, 2001), la relación entre *P. crassa* y *P. cembra* también fue sugerida por Caldwell (1974) quien las

ubicado en el mismo subgrupo (*Hyla crassa*).

Las secuencias correspondientes a la población de *Plectrohyla sp.* de la Sierra de Malinaltepec forman un grupo monofilético fuertemente apoyado, alopatrico, concordante con la geografía, y muy divergente genéticamente. Asimismo, dicha población presenta caracteres morfológicos que permiten diagnosticarla del resto de las especies del grupo *P. bistrincta*. Es la segunda especie más pequeña de la Sierra Madre del Sur después de *P. thorectes*, y a pesar de que comparte con las poblaciones de *P. bistrincta* y *P. cembra* la ausencia de hendiduras bucales, se diferencia de estas por el tamaño (mayor en las últimas dos), además de características de coloración, ya que en *P. sp.* las manchas de los costados son de menor tamaño, y el color del dorso no es verde uniforme, sino que presenta manchas oscuras a lo largo del cuerpo. Esta evidencia indica que esta población representa una especie no descrita. Esta especie es el grupo hermano del clado compuesto por *P. cembra* y *P. miahuatlanensis*. Sin embargo, el valor de soporte de esta relación es bajo.

P. miahuatlanensis y *P. cembra*

Estas especies se distribuyen en la Sierra del Madre del Sur de Oaxaca y están separadas por el río Copalita. Su relación de especies hermanas ya había sido sugerida por Meik et al. (2006), con base en caracteres morfológicos, e indicó que se diferencian por los siguientes caracteres de *P. miahuatlanensis* (condición de *P. cembra* entre paréntesis): hocico en vista dorsal y ventral truncado (redondeado), disco del tercer dedo casi el doble del tamaño del tímpano (disco ligeramente más grande que el tímpano), línea de color bronce que va del canto a la parte posterior de la órbita, presente (ausente), y coloración amarilla en los costados presente (ausente). La revisión morfológica del presente estudio concuerda con dichos caracteres, a excepción de los dos últimos, ya que mediante la colecta de ejemplares vivos se observó que ambas especies (y no sólo *P. miahuatlanensis*) presentan estos caracteres de coloración, aunque son menos marcados en *P. cembra*.

Clados (*P. celata* + *P. siopela*) y (*P. cyclada* + *P. arborescandens*)

El linaje número cuatro está compuesto por dos subclados: uno que incluye a *P. celata* y *P. siopela*, y otro que incluye a *P. cyclada* y *P. arborescandens*. Las cuatro especies que conforman este linaje presentan una morfología muy similar, y hay una variación grande intrapoblacional y geográfica de sus caracteres. Incluso, los ejemplares de estas especies se han confundido unos con otros en numerosas ocasiones (Duellman, 1970; Toal y Mendelson, 1995; Campbell y Duellman, 2000). El único carácter que diferencia un subclado del otro es la presencia de hendiduras bucales en los machos de las especies *P. cyclada* y *P. arborescandens* y su ausencia en los machos de *P. siopela* y *P. celata*. Por tanto, la correcta determinación de estas especies únicamente con datos morfológicos es complicada, y es necesario contar con machos adultos para poder observar las hendiduras bucales.

Las especies *P. celata* y *P. siopela* presentan distribuciones y caracteres morfológicos similares, y un solo carácter diagnóstico para separarlas (la presencia de una quilla rostral en *P. siopela* y su ausencia en *P. celata*). Por tanto, su distintividad debe ser corroborada con un mayor número de secuencias de ejemplares correctamente determinados de *P. siopela*.

Clado (*P. cyclada* + *P. arborescandens*)

Desde su descripción, se ha reconocido un gran número de similitudes entre *P. arborescandens* y *P. cyclada* (Campbell y Duellman, 2000). Los caracteres utilizados para diferenciar a *P. cyclada* fueron (condición de *P. arborescandens* entre paréntesis): canto rostral angular (redondeado), vientre granular (liso), pliegue tarsal presente (ausente), anillo timpánico presente y conspicuo (ausente) y la longitud de la tibia proporcionalmente más larga (proporcionalmente más cortas). Aunado a esto, el patrón de coloración dorsal en *P. arborescandens* se describió como verde uniforme, a diferencia del patrón de *P. cyclada* el cual varía de verde a bronce, con manchas o sin manchas y con una marcada metacrosis.

En la presente hipótesis filogenética, las secuencias de *P. arborescandens* y *P. cyclada* no forman clados separados, sino que se encuentran entremezcladas independientemente de la especie y localidad a la que pertenecen (Puebla, Veracruz, Sierra de Juárez y Sierra Madre del Sur de Oaxaca). Los caracteres utilizados para diferenciarlas únicamente muestran estados distintos en las poblaciones más alejadas de cada especie, mientras que en las poblaciones geográficamente intermedias, los caracteres varían gradualmente pasando de un estado de carácter al otro. Por ejemplo, el canto rostral varía de angular (Puebla y Veracruz) a redondeada (Sierra Madre del Sur, Oaxaca). La coloración tampoco se puede considerar un carácter diagnóstico válido entre estas especies, debido a la marcada metacrosis en esta especie y que en colectas recientes se encontraron individuos con los caracteres diagnósticos de *P. arborescandens* pero una coloración similar a la de *P. cyclada*. La evidencia morfológica y molecular obtenida en el presente estudio sugiere que *P. cyclada* no es una especie válida, si no un sinónimo de la especie *P. arborescandens*.

La distribución de *P. arborescandens* (como *P. cyclada*) incluía la Sierra Mixe y la Sierra de Juárez en el estado de Oaxaca. En este estudio se encontró en San Vicente Laxichio en la Sierra Madre del Sur en Oaxaca. Esta especie es la tercera del grupo, además de *P. crassa* y *P. hazelae* en presentar esta distribución disyunta.

Clado *P. chryses* y *P. mykter*

El clado número seis agrupa a las especies simpátricas *P. mykter* y *P. chryses* con un valor de soporte alto. Varios autores propusieron algunas relaciones entre estas especies y el resto de las especies del grupo *P. bistincta*, y revisaron los caracteres útiles para su diagnóstico (Mendelson y Toal, 1996; Duellman *et al.*, 2001). Sin embargo, la hipótesis de que las especies *P. chryses* y *P. mykter* fueran especies hermanas no había sido sugerida.

Clados *P. bistincta* y (*P. pentheter* + *P. calthula* + *P. ephemera*)

El estrecho parentesco entre estas cuatro especies se ha sugerido repetidamente tanto en las revisiones del grupo, como en la conformación de subgrupos y en las filogenias que

incluyen al género *Plectrohyla*. Estas especies presentan un cuerpo robusto, son muy similares morfológicamente y son simpátricas en el estado de Oaxaca (Caldwell, 1974; Adler y Dennis, 1972; Duellman y Campbell, 1992, Faivovich *et al.*, 2005, Smith *et al.*, 2005, 2007; Wiens *et al.*, 2005, 2006, 2010, Pyron y Wiens, 2011). *Plectrohyla bistincta* puede diferenciarse de las especies *P. pentheter*, *P. calthula* y *P. ephemera* por la presencia de hendiduras bucales en los machos de la primera especie y su ausencia en los machos de las tres últimas.

Clado (*P. pentheter* + *P. calthula* + *P. ephemera*)

El clado que incluye a las especies *P. pentheter* y *P. calthula* representa la única relación que se ha mantenido en todas las hipótesis filogenéticas previas, tanto morfológicas como moleculares, con valores de soporte alto (Duellman, 2001; Faivovich *et al.*, 2005, Smith *et al.*, 2005, 2007; Wiens *et al.*, 2005, 2006, 2010, Pyron y Wiens, 2011). La distribución de *P. pentheter* incluía la Sierra Madre del Sur en los estados de Guerrero y Oaxaca. Sin embargo, mediante la revisión de los ejemplares asignados a *P. pentheter* de la Sierra Madre del Sur en Guerrero, el presente estudio reveló que se trata en realidad de ejemplares de la especie *P. bistincta*, y esto fue corroborado por las secuencias de DNA de ejemplares de Guerrero y Oaxaca. Por tanto, los datos indican que la distribución de *P. pentheter* está restringida a la Sierra Madre del Sur de Oaxaca.

La especie *P. ephemera* fue descrita con base en un solo ejemplar, y los caracteres utilizados para su diagnosis con respecto a *P. pentheter* y *P. calthula* fueron diferencias morfométricas (tamaño significativamente más grande de *P. ephemera*) (Meik *et al.*, 2005). Esta especie no se incluyó en ninguna de las filogenias previas y el presente estudio sugiere que no es válida, debido a que su secuencia se anida dentro del clado fuertemente apoyado de los haplotipos de *P. calthula*. Se sugiere que los estados de carácter considerados como diagnósticos de *P. ephemera* son en realidad parte de la variación intraespecífica de *P. calthula*.

Plectrohyla bistincta

Esta especie la única especie del grupo con una distribución amplia. Sin embargo, en las hipótesis filogenéticas previas, tanto morfológicas como moleculares únicamente se incluyó un ejemplar del estado de Oaxaca (Duellman, 2001; Faivovich *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2005, 2007; Wiens *et al.*, 2005, 2006, 2010; Pyron y Wiens, 2011). El presente estudio sugiere que la especie putativa *P. bistincta* está compuesta de tres linajes distintos (Figura 10, clados 7, 8 y 9) estrechamente emparentados con las especies *P. calthula*, *P. pentheter* y *P. ephemera* (Figura 10, clado 10). Los tres linajes que componen a la especie *P. bistincta* tienen un soporte alto y congruencia geográfica; son alopátricos o parapátricos, mutuamente monofiléticos y considerablemente divergentes genéticamente unos de otros, y poseen caracteres morfológicos que los distinguen entre sí (es decir, son diagnosticables).

El primer linaje se distribuye en los estados de Michoacán y Jalisco, y se puede diferenciar de los dos linajes restantes por la siguiente combinación de caracteres: (1) discos de las manos y tímpano de tamaño proporcionalmente más grandes (con el anillo timpánico parcialmente visible), (2) presencia de manchas y puntos oscuros en el dorso presentes, (3) patas con un medio de membrana y (4) pliegue supratimpánico de menor grosor. El segundo linaje se distribuye en el estado de Guerrero y el oeste del estado de Oaxaca y se puede diferenciar de los dos linajes restantes por la siguiente combinación de caracteres: (1) patas con un tres cuartos de membrana, (2) la presencia de una línea clara en los costados de la axila a la ingle, y (3) manchas de menor tamaño en la parte posterior de los muslos. El tercer linaje se distribuye en los estados de Puebla, Veracruz y Oaxaca y se puede diferenciar de los dos linajes restantes por la siguiente combinación de caracteres: (1) los discos de las manos y tímpano de tamaño proporcionalmente más pequeños, (2) el anillo timpánico ausente, (3) la membrana de las patas es casi completa y (4) el pliegue supratimpánico es grueso (casi cubre por completo el tímpano). Este último linaje incluye la muestra de la localidad tipo, por lo cual con un posterior arreglo de su taxonomía este conservaría el nombre de *P. bistincta*.

Especies no incluidas en la filogenia molecular

La filogenia molecular del presente estudio solo incluyó 17 de las 24 especies que conforman al grupo *P. bistincta*. Las relaciones de las especies *P. charadricola*, *P. sabrina*, *P. labedactyla*, *P. calvicollina*, *P. psarosema*, *P. cyanomma* y *P. pachyderma* con el resto de las especies del grupo *P. bistincta* no pudieron ser evaluadas. La revisión morfológica únicamente permitió evaluar la validez de estas especies, y no se cuenta con evidencia molecular para agruparlas con alguno de los clados. Debido a la extensa perturbación del hábitat de estas especies, no fue posible encontrarlas durante el trabajo de campo para incluirlas en el análisis.

Conclusiones

1. El género *Plectrohyla*, así como los grupos que lo conforman (*P. bistincta* y *P. guatemalensis*) son monofiléticos.
2. La hipótesis filogenética generada en el presente estudio con base en dos genes mitocondriales y tres nucleares discrepa con la hipótesis basada en datos morfológicos en la mayoría de las relaciones interespecíficas, y es concordante con las hipótesis generadas previamente basadas en datos moleculares.
3. El estudio sugiere la existencia de una especie nueva para el grupo *P. bistincta* de la localidad de Malinaltepec Guerrero y que la población de *P. thorectes* de Guerrero se trata en realidad de una especie nueva.
4. El estudio sugiere que las especies *P. cyclada* y *P. ephemera* no son especies validas, sino sinónimos junior de las especies *P. arborescandens* y *P. calthula* respectivamente.
5. Los resultados sugieren que la especie putativa de amplia distribución *P. bistincta* es parafilética con respecto a las especies *P. calthula* y *P. pentheter* y que representa en realidad un complejo de tres especies.
6. Se encontraron seis especies que no se habían registrado en más de ...años.
7. Se amplia el área de distribución de las especies *P. hazelae*, *P. arborescandens*, *P. calthula* y *P. ameibothalame*

Literatura Citada

- Adler, K. 1965. Three new frogs of the genus *Hyla* from the Sierra Madre del Sur of México. Occasional papers of the Museum of Zoology, University of Michigan. 642:1-18
- Adler, K. y D. M. Dennis. 1972. Three new frogs of the genus *Hyla* from the cloud forests of western Guerrero, México. University of Kansas publications, Museum of Natural History. 7:1-19
- Amphibia Web: Information on amphibian biology and conservation. [web application]. 2013. Berkeley, California: Amphibia Web. Available: <http://amphibiaweb.org/>. (Accessed: Sep, 2011).
- Bonfield, J. K., K. F. Smith y R. Staden. 1995. A new DNA sequence assembly program. Nucleic Acids Res. 23:4992-4999
- Bossuyt, F., M. C. Milinkovitch.. 2000. Convergent adaptive radiations in Madagascan and Asian ranid frogs reveal covariation between larval and adult traits. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA 97, 6585–6590.
- Brocchi, P. 1877. Description d'un nouveau genre de Phaneroglossa Hylaeforme (*Plectrohyla guatemalensis*). Bulletin de la Société Philomatique de Paris. 1:92-93.
- Caldwell, J. P. 1974. A re-evaluation of the *Hyla bistincta* species group, with descriptions of three new species (Anura: Hylidae). Occas. Papers. University of Kansas publications, Museum of Natural History. 28:1-37.
- Campbell, J. A. y W. E. Duellman. 2000. New species of stream-breeding Hylid frogs from the northern versant of the Highlands of Oaxaca, México. University of Kansas publications, Museum of Natural History. 16:1-28
- Canseco-Márquez, L. y G. Gutiérrez-Mayén. 2002. A new species of *Hyla* (Anura: Hylidae) from the Mixteca Alta, Oaxaca, México. Herpetologica. 58:260-269.
- Cope, E. D. 1877. Tenth contribution to the herpetology of tropical America.

- Proceedings of the American Philosophical Society. 17:85-98.
- Duellman, W. E. 1964. A review of the frogs of the *Hyla bistincta* group. University of Kansas publications, Museum of Natural History.15:469-491
- Duellman, W. E. 1968. Descriptions of new hylid frogs from México and Central América. University of Kansas publications, Museum of Natural History. 17:559-578
- Duellman, W. E. 1970. Hylid frogs of Middle America. Monographs of the Museum of Natural History, University of Kansas. Lawrence, KS.752 pp.
- Duellman, W. E. 2001. The Hylid Frogs of Middle America. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Ithaca, New York, USA. 1170 pp.
- Duellman, W. E. y J. A. Campbell. 1992. Hylid frogs of the genus *Plectrohyla*: systematics and phylogenetic relationships. Miscellaneous Publications, Museum of Zoology, University of Michigan. 181:1-32.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res. 32:1792-1797
- Faivovich, J., C. F. B. Haddad, P. C. A. Garcia, D. R. Frost, J. A. Campbell, y W. C. Wheeler. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hyalinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. Bulletin American Museum of Natural History 294:1–240.
- Fetzner, Jr. James W. 1999. Extracting high-quality DNA from shed reptile skins: A simplified method. BioTechniques. 26:1052-1054.
- Frías-Alvarez, P., V. T. Vredenburg, M. Familiar-López, J. E. Longcore, E. González-Bernal, G. Santos-Barrera, L. Zambrano y G. Parra-Olea. 2008. Chytridiomycosis survey in wild and captive Mexican amphibians. EcoHealth 5:18-26.
- Frías-Alvarez, P., J. J. Zúñiga-Vega, y O. Flores-Villela. 2010. A general assessment of the conservation status and decline trends of Mexican amphibians. Biodiversity and Conservation. 19:3699–3742.
- Frost, D. R. 2011. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.4 (3 September, 2011). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/> American Museum of Natural

- History, New York, USA.
- Hermes P. y R. Aguilar. 2011. *Plectrohyla hazelae* (Taylor, 1949) Not extinct. Herpetological Review. 2011, 42:41-42.
- Huelsenbeck, J. P. y B. Rannala. 2004. Frequentist properties of Bayesian posterior probabilities. Systematic Biology 53: 904-913.
- Larget, B. y D. L. Simon. 1999. Markovchain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 16:750-759.
- Lips, K. R., J. R. Mendelson Jr. III, A. Muñoz-Alonso, L. Canseco-Márquez y D. G. Mulcahy. 2004. Amphibian population declines in montane southern Mexico: resurveys of historical localities. Biology Conservation. 119:555-564.
- Lis T. y R. Schleif. 1975. The regulatory Region of the L-arabinose Operon: Its Isolation on a 1000 Base-pair Fragment from DNA Heteroduplexes. Journal of Molecular Biology. 95:409-416.
- Maddison, D. R. y W. P. Maddison, 2005. MacClade 4: Analysis of phylogeny and character evolution. Version 4.08a. <http://macclade.org>.
- Maddison, W. P. y D. R. Maddison. 2007. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.0 <http://mesquiteproject.org>
- Meik, J. M., L. Canseco-Márquez, E. N. Smith y J. A. Campbell. 2005. A new species of *Hyla* (Anura: Hylidae) from Cerro Las Flores, Oaxaca, México. Zootaxa. 1046:17-27.
- Meik, J. M., E. N. Smith, L. Canseco-Márquez y J. A. Campbell. 2006. New Species of *Plectrohyla bistincta* Group (Hylidae: Hylinae: Hylini) from Oaxaca, México. Journal of Herpetology. 40:304-309.
- Mendelson, J. R. III y E. K. Kabay. 2009. On the distribution and status of *Plectrohyla hazelae* (Taylor, 1940) (Amphibia: Hylidae) from Oaxaca, Mexico. Herpetological Review. 40:301-302.
- Mendelson, J. R. III, y K. R. Toal. 1996. A new species of *Hyla* (Anura: Hylidae) from the Sierra Madre del Sur of Oaxaca, Mexico, with comments on *Hyla chryses* and *Hyla mykter*. Journal of Herpetology 30:326-333.
- Nylander, J. A., A., F. Ronquist, J. P. Huelsenbeck, y J. L. Nieves Aldrey. 2004. Bayesian phylogenetic analysis of combined data. Systematic Biology. 53:47-67.

- Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*. 25:1253-1256.
- Posada, D. y T. R Buckley. 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of the AIC and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology*. 53:793-808.
- Pyron, R. A. y J. J. Wiens. 2011. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 61:543-583.
- Ronquist, F. y J. P. Huelsenbeck. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Saiki R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis y H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. Jan 29. (4839): 487-91.
- Smith, S. A., P. R. Stephens y J. J. Wiens. 2005. Replicate patterns of species richness, historical biogeography, and phylogeny in Holarctic treefrogs. *Evolution*. 59:2433–2450.
- Smith, S. A., A. Nieto-Montes de Oca, T. W. Reeder, y J. J. Wiens. 2007. A phylogenetic perspective on elevational species richness patterns in Middle American treefrogs: why so few species in lowland tropical rainforests. *Evolution*. 6:1188-1207.
- Stuart S. N., J. S. Chanson, N. A. Cox, B. E. Young, A. S. L. Rodriguez, D. L. Fishman y R. W. Waller. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*. 306:1783-1786.
- Sullivan, J. y P. Joyce. 2005. Model selection in phylogenetics. *Annual Review of Ecology and Systematics*., 36:445-466.
- Tamura K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei y S. Kumar. 2011. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28:2731-2739.
- Taylor, E. H., 1938. New species of Mexican tail less Amphibia. *Occasional Papers University of Kansas publications, Museum of Natural History*. 25:385-405.

- Taylor, E. H. 1940. New species of Mexican Anura. Occasional Papers University of Kansas publications, Museum of Natural History. 26:385-405.
- Taylor, E. H. 1942. New Caudata and Salientia from México. Occasional Papers University of Kansas publications, Museum of Natural History. 28:295-323.
- Toal, K. R. 1994. A new species of *Hyla* (Anura: Hylidae) from the Sierra de Juárez, Oaxaca, México. *Herpetologica* 50:187-193.
- Toal, K. R., y J. R. Mendelson III. 1995. A new species of *Hyla* (Anura: Hylidae) from cloud forest in Oaxaca, Mexico, with comments on the status of the *Hyla bistincta* group. Occasional Papers University Kansas. Publication Museum Natural History 174:1-20.
- Ustach, P. C., J. R. Mendelson III, R. W. McDiarmid y J. A. Campbell. 2000. A new species of *Hyla* (Anura: Hylidae) from the Sierra Mixes, Oaxaca, Mexico, with comments on ontogenetic variation in the tadpoles. *Herpetologica*. 56:239-250.
- Wiens J. J. 1998. Combining data sets with different phylogenetic histories. *Systematic Biology*. 47: 568–581.
- Wiens, J. J., y T. L. Penkrot. 2002. Delimiting species based on DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (*Sceloporus*). *Systematic Biology*. 51:69–91.
- Wiens, J. J., J. W. Fetzner, C. L. Parkinson y T. W. Reeder. 2005. Hylid frog phylogeny and sampling strategies for speciose clades. *Systematic Biology*. 54:719–748.
- Wiens, J. J., C. H. Graham, D. S. Moen, S. A. Smith y T. W. Reeder. 2006. Evolutionary and ecological causes of the latitudinal diversity gradient in hylid frogs: treefrog trees unearth the roots of high tropical diversity. *The American Naturalist*. 168:579–596.
- Wiens, J. J., C. A. Kuczynski, X. Hua y D. S. Moen. 2010. An expanded phylogeny of treefrogs (Hylidae) based on nuclear and mitochondrial sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 55:871–882.
- Wiens, J. J., C. A. Kuczynski y P. R. Stephens. 2010b. Discordant mitochondrial and nuclear gene phylogenies in emydid turtles: implications for speciation and conservation. *Biological Journal of the Linnean Society*. 99:445–461.

Anexo 1. Secuencias utilizadas en el presente estudio

Especie No. de colecta	Localidad	Mitocondriales		Nucleares		
		ND1	12 S	Rag-1	Rhod	POMc
Grupo <i>Plectrohyla bistincta</i>						
<i>Plectrohyla ameibothalame</i>						
1. MZFC-7480	Oaxaca: San Pedro Nopala: Yosocuno	GB	GB			
2. ANMO-2623	Oaxaca: San Cristóbal Suchixtlahuaca	X	X	X		X
<i>Plectrohyla arborescandens</i>						
1. ISZ-171	Puebla: Tlatlauquitepec	X		X		
2. JLAL-304	Puebla: Sierra Negra	X	X	X		X
3. UTA-56283	Puebla: Sierra Negra		GB	GB	GB	
4. JLAL-27	Veracruz: La carbonera	X		X	X	
<i>Plectrohyla bistincta</i>						
1. UOVG-1834	Guerrero: Malinaltepec	X				
2. UOGV-1835	Guerrero: Malinaltepec	X		X	X	
3. MK-685	Guerrero: Puerto del Gallo	X				
4. MK-689(2)	Guerrero: Puerto del Gallo	X				
5. JCBH-085	Guerrero: El Molote	X	X	X		X
6. 083	Jalisco: Sierra de Quila	X		X	X	X
7. IVAN	Jalisco	X				
8. UOGV-1553	Michoacán: Indaparapeo	X		X	X	X
9. MK-666	Michoacán: Zitacuaro	X				
10. MK-645	Morelos: Cuernavaca	X				
11. ANMO-2728	Oaxaca: Santa María Nizaviguiti: Cerro Piedra Larga	X				
12. JAC-22650	Oaxaca: Cuicatlan: Tutepetongo		GB	GB	GB	
13. LCM-1202	Oaxaca: Cuicatlan: Tutepetongo	X		X	X	

14. MK-718(2)	Oaxaca: San Miguel Aloapan	X				
15. MK-748(2)	Oaxaca: Ayutla	X				
16. MK-766	Oaxaca: San Juan Lachao: Santa Catarina Cerro de Vidrio	X				
17. MK-767	Oaxaca: Santa María Albarradas	X				
18. ANMO-2353	Oaxaca: Santiago Comaltepec	X	X	X		X
19. ANMO-2460	Oaxaca: Santa María Laxichio	X	X	X		X
20. ANMO-1898	Oaxaca: Santa María Yucuhiti	X	X	X	X	X
21. RVG-199	Oaxaca: San Jerónimo Recoatl: Puente Grande	X				
22. ANMO-2644	Oaxaca: San Vicente Laxichio	X				
23. MK-705(2)	Oaxaca: Huautla de Jiménez	X				
24. JLAL-174	Oaxaca: Zoquiapan boca de los ríos: Sierra Monte Flor	X		X	X	
25. MK-700(2)	Puebla: Zoquitlan	X				
26. CDR-241	Puebla: Lagunas de San Bernardino	X	X	X	X	X
27. MK-697(3)	Veracruz: Xoxocotla	X				

Plectrohyla calthula

1. JAC-21167	Oaxaca: Santiago Zacatepec		X	GB	GB	
2. AMH	Oaxaca: Totontepec Villa de Morelos	X	X	X	X	X
3. LCM	Oaxaca: Santa María Alotepec	X				
4. JAC-7808	Oaxaca: Totontepec Villa de Morelos		GB			

Plectrohyla celata

ANMO-2377	Oaxaca: San Pablo Macuiltianguis: El aserradero	X	X			
-----------	---	---	---	--	--	--

Plectrohyla cembra

ANMO-2769	Oaxaca: San Miguel Suchixtepec: Río Molino	X	X	X	X	X
-----------	--	---	---	---	---	---

Plectrohyla chryses

TJD-753	Guerrero: Carrizal de Bravo: El Asoleadero	X		X		
---------	--	---	--	---	--	--

<i>Plectrohyla crassa</i>						
	Oaxaca: San Miguel Aloapan	X		X	X	X
<i>Plectrohyla cyclada</i>						
1. ICS-128	Oaxaca: San Juan Atepec	X		X	X	
2. GP-1616	Oaxaca: Santiago Comaltepec	X	X	X	X	X
3. ICS-132	Oaxaca: Cerro San Felipe			X	X	
4. ICS-102	Oaxaca: San Pedro Yolox	X		X		
5. JAC-21532	Oaxaca: Totontepec Villa de Morelos	GB	GB	GB	GB	GB
6. UOGV-357	Oaxaca: San Juan Tepeuxila			GB		
7. JMR-4774	Oaxaca: San Pablo Macuiltianguis	X				
8. ANMO-2728	Oaxaca: San Pedro el Alto: Zimatlán: La cofradía	X				
<i>Plectrohyla ephemera</i>						
JAC-22944	Oaxaca: Entre Santa María Guienagati y Lachidola	X	X	X	X	X
<i>Plectrohyla hazelae</i>						
1. MK-770	Oaxaca: Santa Catarina Ixtepeji: El Punto	X	X	X	X	X
2. ANMO-2645	Oaxaca: San Vicente Laxichio	X	X	X		X
<i>Plectrohyla miahuatlanensis</i>						
JAC-21228	Oaxaca: Candelaria Loxichia: Sierra de Miahuatlan	X	X	X	X	X
<i>Plectrohyla mykter</i>						
1. TJD-783	Guerrero: Chilpancingo: El Tejocote	X	X	X		X
2. JMR-4631	Guerrero: Carrizal de Bravo	X				
3. JMR-4632	Guerrero: Carrizal de Bravo	X	X	X	X	X
<i>Plectrohyla pentheter</i>						
1. ANMO-1058	Oaxaca: San Gabriel Mixtepec	X	X	X	X	X
2. ISZ-497	Oaxaca: Pluma Hidalgo	X		X	X	

3. MZFC-15852	Oaxaca: Entre Candelaria Loxicha y San Pedro el Alto	GB	GB			X
<i>Plectrohyla robertsororum</i>						
ANMO-2665	Hidalgo: Zoquizoquipan	X	X	X		X
<i>Plectrohyla thorectes</i>						
1. ANMO-2032	Oaxaca: San Gabriel Mixtepec	X	X	X	X	X
2. JAC-22224	Guerrero: Nueva Delhi – La Guitarra		GB	GB	GB	
<i>Plectrohyla siopela</i>						
5768	No Determinado					GB
<i>Plectrohyla sp.</i>						
1. UOGV-1857	Guerrero: Malinaltepec	X				
2. UOGV-1858	Guerrero: Malinaltepec	X		X	X	X
Grupo externo						
<i>Plectrohyla chrysopleura</i>						
USNM-514404	Honduras: Atlantida: Parque Nacional Pico Bonito	GB	GB			GB
<i>Plectrohyla glandulosa</i>						
1. ENS-8325	Guatemala: San Marcos: Esquipulas Palo Gordo Agua Caliente Chiquito	GB	GB			GB
2. MVZ-149403	Guatemala: San Marcos: El Rincón		GB	GB	GB	
<i>Plectrohyla guatemalensis</i>						
1. UTA-55140	Guatemala: Santa Rosalia: Carretera a El Salvador		GB	GB	GB	
2. ENS-10143	México: Oaxaca: Carretera Vista Hermosa a Valle Nacional		GB			GB
<i>Plectrohyla matudai</i>						
JAC-21707	México: Chiapas: Colonia Rodolfo Figueroa		GB	GB	GB	
<i>Exerotonta abdivita</i>						
JJW-1027	México: Oaxaca: San Felipe Jalapa de Díaz	GB	GB			GB
<i>Exerotonta chimalapa</i>						

JAC-21736	México: Chiapas: Colonia Rodolfo Figueroa	GB	GB	GB	GB	GB
<i>Exerotonta melanomma</i>						
1. ENS-10042	México: Oaxaca: Vista Hermosa	GB	GB			GB
2. UTA-54766	México: Oaxaca: Carretera a Pochutla		GB	GB	GB	
<i>Exerotonta perkinsi</i>						
1. ENS-8948	Guatemala: Huehuetenango	GB	GB			GB
2. UTA-54721	Guatemala: Huehuetenango: Barillas, Aldea Nucaquexis		GB	GB	GB	
<i>Exerotonta smaragdina</i>						
JJW-1035	México: Puebla: Izucar de Matamoros	GB	GB			GB
<i>Exerotonta sumichrasti</i>						
MZFC-15811	México: Oaxaca: San Gabriel Mixtepec: Río Salado		GB			GB
<i>Exerotonta Xera</i>						
1. JAC-22371	México: Puebla: Texcala-Zapotitlan de las Salinas		GB	GB	GB	
2. EBUAP-1121	México: Puebla: San Juan Raya		GB			GB
<i>Ecnomiohyla miotypanum</i>						
1. UTA-52560	México: Veracruz: Sierra de los Tuxtlas Victoria	GB	GB			GB
2. JAC-22438	México: Puebla: Cuetzalan		GB	GB	GB	