



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

**INSTITUTO DE BIOLOGÍA
SISTEMÁTICA**

**SISTEMÁTICA MOLECULAR DEL COMPLEJO *Pseudoeuurycea cephalica* (CAUDATA:
PLETHODONTIDAE) Cope, 1865**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(SISTEMÁTICA)**

PRESENTA:

BIOL. JORGE FERNANDO SÁNCHEZ SOLÍS

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Gabriela Parra Olea

Instituto de Biología

COMITÉ TUTOR:

Dr. Adrián Nieto Montes de Oca

Facultad de Ciencias

M.en C. Laura Margarita Marquéz Valdelamar

Instituto de Biología

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 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.

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

Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento: Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 2 de Septiembre de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (SISTEMÁTICA)** del alumno **SÁNCHEZ SOLÍS JORGE FERNANDO** con número de cuenta **99302043** con la tesis titulada "**Sistemática Molecular del complejo *Pseudoeurycia cephalica* (Caudata: Plethodontidae) Cope, 1865**", realizada bajo la dirección de la **DRA. GABRIELA PARRA OLEA**:

Presidente: DR. OSCAR ALBERTO FLORES VILLELA
Vocal: DRA. ELLA GLORIA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ
Secretario: M. EN C. LAURA MARGARITA MÁRQUEZ VALDELAMAR
Suplente: DR. JOSÉ MARTÍN GARCÍA VARELA
Suplente: DR. ADRIAN NIETO MONTES DE OCA

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 7 de noviembre de 2013.

María del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca asignada para cursar este posgrado con el número 254289 y la beca mixta 370153 para realizar una estancia en la University of California at Berkeley. Al Apoyo Económico para Estudios de Posgrado, del Posgrado de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, para solventar la asistencia a curso REGENEC y el World Congress of Herpetology. Al apoyo financiero PAPIIT-UNAM IN211808 y PAPIIT-UNAM IN212111 a cargo de la Dra. Gabriela Parra Olea para poder realizar las actividades pertinentes para este trabajo.

Comité Tutorial

Dra. Gabriela Parra Olea

Dr. Adrián Nieto Montes de Oca

M. en C. Laura Margarita Márquez Valdelamar

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Gabriela Parra Olea por enseñarme, asesorarme, apoyarme y aconsejarme en este proceso de crecimiento profesional y personal lo cual significo mucho para mi y este proyecto.

A la M. en C. Laura Margarita Márquez Valdelamar, que siempre estuvo para ayudarme en el laboratorio y asesorarme, así como las valiosas aportaciones en la revisión de este trabajo. El Dr. Adrián Nieto Montes de Oca por sus valiosos comentarios y aportaciones a este trabajo. Al comité del Jurado Dra. Ella Gloria Vázquez Domínguez, Dr. José Martín García Varela por su tiempo, paciencia y aportaciones en este trabajo y en la clases. Al Dr. Oscar Alberto Flores Villela tanto por su tiempo, sus aportaciones, comentarios, el asesoramiento, el mostrarme y ayudarme en la búsqueda de esas colecciones literarias científicas invaluable de la herpetología.

Al Dr. Sean Michael Rovito por su ayuda y enseñanza para la utilización de las herramientas informáticas para realizar inferencias filogenéticas, por compartir su conocimiento en las salidas a campo que realizamos, muchas de sus aportaciones fueron muy importantes para este trabajo.

Al Dr. David B. Wake por sus explicaciones acerca de la historia taxonómica de las salamandras de este trabajo.

A Daniel Pinacho² y José Alberto Cruz (Fauno) por su ayuda y explicaciones en los SIG, así como su amistad. A mis compañeros del laboratorio; Sergio Vela, Cinthya, Laura, Aldo, Rafa y por supuesto Mirna (*Mirna bonetii*). A mis amigos del Instituto de Biología; David H. (Pandilla), Noemí, Dragón, Sara, Ángeles de Charly, Flavia, Vla, Javo, Tom y Paty, así como a los cuatro fantásticos por compartir esos momentos muy amenos dentro y fuera del Instituto.

A Cristina del Río por sus revisiones y por compartir un sentimiento mutuo.

A Rocío, Armando y Lidia que hicieron que los tramites dentro del posgrado no fueran tan engorrosos.

A mi familia y amigos, y a todos aquellos que me acompañaron durante esta etapa de mi vida y que no mencione.

Con todo mi cariño y amor para;

Mis padres

María Solís

Pedro Fernando

Mi hermano

Daniel

Siempre me han impulsado y ayudado son el ejemplo más grande de amor, apoyo y perseverancia para mi.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVO GENERAL	8
OBJETIVOS PARTICULARES	8
MATERIAL Y MÉTODOS	9
Búsqueda bibliográfica.....	9
Muestras	9
Trabajo de laboratorio.....	9
Análisis de secuencias	11
Análisis de datos.....	12
Partición de genes	12
Inferencia Filogenética	
1.1 Genes mitocondriales.....	14
1.2 Genes nucleares	14
1.3 Evidencia total.	15
1.3 Delimitación de taxones.	15
RESULTADOS	16
Información genética	
Genes mitocondriales	16
Genes nucleares.....	16
Análisis filogenéticos	
Datos mitocondriales	17
Datos nucleares	18
Datos nucleares concatenados.....	19
Evidencia total	20
DISCUSIÓN	21
Historia y clados del complejo <i>Pseudoeurycea cephalica</i>	22
Acercamiento geográfico.....	25
CONCLUSIONES	27
BIBLIOGRAFÍA	28

ANEXOS	36
TABLAS	
Tabla 1. Localidades de colecta del complejo <i>P.cephalica</i>	36
Tabla 2. Reactivos y volúmenes usados en la reacción de PCR.....	38
Tabla 3.- Programas utilizados para la amplificación.....	39
Tabla 4.- Modelos y resultados del factor Bayes para las estrategias de partición.	40
Tabla 5. Sustitución y porcentaje de nucleótidos para los genes 12S y RNAt.....	41
Tabla 6. Sustitución y porcentaje de nucleótidos para el gen 16S.....	41
Tabla 7. Sustitución y porcentaje de nucleótidos para el gen ND1.....	41
Tabla 8. Sustitución y porcentaje de nucleótidos para el gen RAG-1.....	42
Tabla 9. Sustitución y porcentaje de nucleótidos para el gen POMC.....	42
Tabla 10. Sustitución y porcentaje de nucleótidos para el gen BDNF.....	42
Tabla 11. Distancias genéticas corregidas del gen mitocondrial ND1.....	42
Tabla 12. Lista de Sinonimias para las especies del complejo <i>P.cephalica</i>	43
FIGURAS	
Fig. 1. Distribución y sitios de colecta del complejo <i>P. cephalica</i>	45
Fig. 2. Árbol resultado del análisis Bayesiano para los genes mitocondriales concatenados de 6 particiones (LnP= -14472.766 +/- D.S.=0.395). Se indican los valores de probabilidad posterior para el apoyo de las ramas en los internodos.....	46
Fig. 3. Árbol del análisis Bayesiano para los genes mitocondriales 12S,16S y RNAt de 3 particiones (LnP= -9148.269 +/- D.S.=0.333). Se indican los valores de probabilidad posterior para el apoyo de las ramas en los internodos.....	47
Fig. 4. Árbol del análisis Bayesiano para los genes mitocondriales ND1 de 3 particiones (LnP= -5093.506 +/- D.S.=0.399). Se indican los valores de probabilidad posterior para el apoyo de las ramas en los internodos.....	48
Fig. 5. Árbol del análisis Bayesiano para los gen nuclear RAG-1 de 3 particiones (LnP= -1637.174 +/- D.S.=0.333). Se indican los valores de probabilidad posterior para el apoyo de las ramas en los internodos.....	49
Fig. 6. Árbol del análisis Bayesiano para los gen nuclear POMC de 3 particiones (LnP= -1602.411 +/- D.S.=0.242). Se indican los valores de probabilidad posterior para el apoyo de las ramas en los internodos.....	50
Fig 7. Árbol del análisis Bayesiano para los gen nuclear BDNF de 3 particiones (LnP= -1701.642 +/- D.S.=0.219). Se indican los valores de probabilidad posterior para el apoyo de las ramas en los internodos.....	51
Fig. 8. Árbol del análisis Bayesiano para los genes nucleares concatenados de 9 particiones (LnP= -4963.503 +/- D.S.=0.414). Se indican los valores de probabilidad posterior para el apoyo de las ramas en los internodos.....	52
Fig. 9. Árbol del análisis Bayesiano de la evidencia total con 15 particiones (LnP= -20220.214 +/- D.S.=0.473). Se indican los valores de probabilidad posterior para el apoyo de las ramas en los internodos y los nombres con los taxones encontrados y las sugerencias.....	53
Fig. 10. Mapa de los patrones de distribución de acuerdo al Árbol bayesiano de la evidencia total denotando tres Clados.....	54

RESUMEN

El género *Pseudoeurycea*, prácticamente endémico de México, contiene únicamente tres especies que presentan distribuciones relativamente amplias: *Pseudoeurycea bellii*, *P. leprosa* y *P. cephalica*. Para la especie *P. cephalica* se han descrito, en la parte nominal, tres subespecies; *P.c.cephalica*, *P. c. manni*, y *P. c. rubrimembris*, cuya validez y distribución no ha sido revisada desde su descripción. El ahora llamado complejo *cephalica*, actualmente está conformado por cinco especies (*P. cephalica*, *P. galeanae*, *P. scandens*, *P.cafetalera* y *P.quetzalanensis*) y las subespecies, muchas de estas especies habitan en zonas altas, con distribuciones aisladas y restringidas a montañas o pequeñas cordilleras. Para resolver los problemas taxonómicos presentes en este grupo se muestreó ampliamente la distribución de las especies que forman este complejo y se utilizaron herramientas moleculares para esclarecer las relaciones filogenéticas. Se amplificaron y analizaron: tres fragmentos de la mitocondria (12S, 16S, ND1 y tRNA; V, I, L, Q) y tres genes nucleares (POMC, BDNF y RAG-1), por separado y en conjunto (evidencia total). Las inferencias filogenéticas se realizaron mediante análisis Bayesianos (MrBayes) para cada una de las estrategias de análisis con la información genética obtenida. Los resultados en los genes mitocondriales concatenados fue de siete clados. Para los genes nucleares concatenados fue de tres clados. En la evidencia total observamos algunos clados con probabilidad posterior mayor a 95% y que también se observaron en los genes mitocondriales: El Clado I formado poblaciones del estado de Tamaulipas, siendo *P. galeanae* grupo hermano de este clado; el Clado II formado por poblaciones de Querétaro y San Luis Potosí; el Clado III Hidalgo región norte; Clado IV Hidalgo región sur; Clado V con poblaciones de Veracruz incluyendo a la especie *P. cafetalera*, el clado VI que incluye poblaciones de Cruz Blanca, Veracruz y Ahuazotepec en Puebla y finalmente el Clado VII con las poblaciones del Eje Neovolcánico Transversal y como grupo hermano a *P. quetzalanensis*. Con los resultados obtenidos podemos sugerir la existencia de dos nuevos taxones (Clado I y Clado II). Así mismo se pueden reconocer los dos clados de Hidalgo como unidades evolutivas independientes y utilizar los nombres disponibles: *P. manni* y *P. rubrimembris*. Se propone se restrinja a *P. cephalica* para las poblaciones del Eje Neovolcánico Transversal. Finalmente, en este trabajo se apoya la independencia evolutiva de *P. quetzalanensis* y *P. cafetalera*.

ABSTRACT

The genus *Pseudoeurycea* almost endemic to Mexico, contains only three species which have relatively broad distributions: *Pseudoeurycea bellii*, *P.leprosa* and *P.cephalica*. For the species *P.cephalica* there are three nominal subspecies; *P.c.cephalica*, *P.c.manni*, and *P.c.rubrimembris*, the validity and distribution of these species has not been revised since its description. The now called *cephalica* complex currently consists of five species (*P.cephalica*, *P.galeanae*, *P.scandens*, *P.cafetalera* and *P.quetzalanensis*) these species inhabit upland areas, with restricted distributions isolated to mountains or small ridges. To solve the taxonomic problems present, this group was sampled extensively on the distribution of the species that form this complex; molecular tools were used to elucidate the phylogenetic relationships. Three fragments of mitochondria were amplified and analyzed (12S, 16S, ND1 and tRNA, V, I, L, Q), as well as three nuclear genes (POMC, BDNF and RAG-1). They were analyzed separately and as a whole (total evidence). The phylogenetic inferences were performed using Bayesian analysis (MrBayes) for each of the analysis strategies with the genetic information obtained. The results on the concatenated mitochondrial genes was seven clades. For nuclear concatenated genes was three clades. In the total evidence we observed some clades with posterior probability greater than 95 % which is also observed in the mitochondrial genes: The clade I from Tamaulipas state populations, with *P.galeanae* sister group of this clade, the clade II consists of populations of Queretaro and San Luis Potosi, clade III for the northern part of Hidalgo, clade IV for the southern part of Hidalgo, Clade V including the species *P.cafetalera* from Veracruz populations, the clade VI including populations from Cruz Blanca in Veracruz and Ahuazotepec in Puebla and finally the Clade VII including populations from Mexican Volcanic Belt with as sister group to *P.quetzalanensis*. The results we can suggest the existence of two new taxa (Clade I and Clade II). Also you can recognize the two clades of Hidalgo as independent evolutionary units and use the available names: *P.manni* and *P.rubrimembris*. We propose to restrict *P.cephalica* to populations from Mexican Volcanic Belt. Finally, this analysis supports the evolutionary independence of *P.quetzalanensis* and *P.cafetalera*.

INTRODUCCIÓN

Los caudados, los anuros y las cecalias son los tres grandes grupos de anfibios que existen en el planeta. Las salamandras tienen una edad estimada entre 150 y 229 millones de años (Roelants et al., 2007, Pyron, 2011). Éstas presentan una distribución holártica (Roelants et al., 2007; Pyron, 2011). La mayor diversificación que presentó el grupo fue entre el Cretácico y Terciario temprano (Roelants et al. 2007). El orden cuenta con un total de 644 especies incluidas en 67 géneros (Zhang y Wake, 2009; Amphibiaweb, 2013). Este número de especies representa aproximadamente el 9% de la diversidad de anfibios a nivel mundial (Vieites et al. 2007; Amphibiaweb, 2013). Actualmente se encuentran agrupadas en 10 familias: Cryptobranchidae, Hynobiidae, Sirenidae, Ambystomatidae, Dicamptodontidae, Salamandridae, Proteidae, Rhyacotritonidae, Amphiumidae y Plethodontidae.

La familia Plethodontidae ha tenido una gran diversificación, con una notable diferenciación morfológica y ecológica (Lombard et al., 1986; Mueller et al., 2004; Wake, 2009). Los plelodóntidos se han adaptado a diferentes hábitats: acuáticos, arbóreos, terrestres, fosoriales y cavernícolas. Esta familia se compone de 433 especies descritas, representando el 68% de todas las especies de salamandras a nivel mundial (Mueller et al., 2004; Vieites et al., 2007; Amphibiaweb, 2013). Los plelodóntidos se encuentran primordialmente en el continente Americano, en donde radica el 98% de las especies; adicionalmente existe un 1.9% de especies en Europa y solo un género monoespecífico (*Karsenia*) en Asia (Vieites et al., 2007; Amphibiaweb, 2013). Actualmente, dentro de la familia Plethodontidae se reconocen dos subfamilias: Hemidactylinae y Plethodontinae. Ésta última a su vez se subdivide en tres tribus: Bolitoglossini, Hemidactyliini y Plethodontini (Larson et al., 2006; Amphibiaweb, 2013; Frost, 2013).

Los bolitoglosinos se caracterizan por tener desarrollo directo y como todos los plelodóntidos, carecen de pulmones llevándose la respiración a través de la piel (Lombard et al., 1986; Mueller et al., 2004; Wake, 2009). Este grupo se distribuye desde el noroeste de México hasta Bolivia y Brasil, en un gradiente altitudinal que va desde el nivel del mar hasta los 5000 m y se encuentran en diversos hábitats desde zonas arenosas de playa hasta el bosque de pino (Wake, 1987; Parra-Olea et al., 2004; Wake, 2009). Asimismo, los bolitoglosinos exhiben una

gran diversidad morfológica, que incluye desde especies miniatura, hasta aquellos gigantes, fosoriales, terrestres y arborícolas (Wake, 1987; Wake, 2009). La diversidad más alta de bolitoglosinos se encuentra distribuida en regiones montañosas de Mesoamérica, lo que incluye una parte importante del territorio nacional a través de sus sistemas montañosos (Wiens et al., 2007).

En México, los bolitoglosinos contribuyen significativamente a la diversidad de especies y asimismo con la alta diversidad biológica del país. Los primeros trabajos taxonómicos donde se describieron especies de este grupo fueron realizados por Taylor en 1938, 1940 y 1944. El grupo de los bolitoglosinos actualmente cuenta con un total de 114 especies en 13 géneros, representando el 31% de la fauna total de anfibios del país (Amphibiaweb, 2013).

Dentro de los bolitoglosinos el género más diverso en México (y con solo algunas especies en Guatemala) es el género *Pseudoeurycea*. Este género fue originalmente propuesto por Taylor (1944). Muchas de sus especies tienen morfología generalizada y se encuentran distribuidas en microhábitats terrestres de bosques de pino, pino-encino, casi siempre alrededor de los 2000 m (Wake y Lynch, 1976; Parra-Olea, 2002). Por su morfología generalizada, las relaciones filogenéticas de las especies de *Pseudoeurycea* aún no están completamente resueltas con base en este tipo de caracteres (Parra-Olea, 2002; Parra-Olea et al., 2005). Hasta ahora existen 48 especies reconocidas. De éstas, *Pseudoeurycea orchimelas* es la única que se encuentra cerca de bosques tropicales a nivel del mar. Por otra parte, solo cuatro especies se localizan por debajo de los 1000 m, en tierras bajas tropicales (*P. maxima*, *P. orchileucos*, *P. orchimelas* y *P. werleri*). Otras cinco especies (*P. lineola*, *P. nigromaculata*, *P. praezellens*, *P. scandens* y *P. quetzalanensis*) habitan en bosques nublados entre los 1000 y 2000 m. Las 38 especies restantes habitan bosques de pino-encino, por arriba de los 2000 m (Parra-Olea et al., 2005; 2010).

Autores como Wake y Lynch (1976) y Parra-Olea (2002) señalan la necesidad de evaluar el *status* taxonómico del género, ya que se suponía que *Pseudoeurycea* era parafilético. Es por ello que en la última década se han utilizado las herramientas moleculares a través de la secuenciación de diferentes genes para resolver problemas taxonómicos e inferir las relaciones evolutivas de estos organismos (Barraclough y Nee, 2001; Vietes et al., 2007; Wiens, 2007). Los

trabajos mas recientes que abordan la problemática de *Pseudoeurycea* y que aplican herramientas moleculares son precisamente los de Parra-Olea (2002) y Wiens et al. (2007), que reconocen tres grupos de especies a partir de análisis de genes mitocondriales: Grupo *P. leprosa*, Grupo *P.gadovii* y Grupo *P.bellii*.

El grupo *P. leprosa* es morfológicamente heterogéneo e incluye formas típicamente terrestres como *P. leprosa*, *P. werleri* y *P. mystax*, así como formas semiarbóreas como *P. nigromaculata* y *P. lynchi*, y por último algunas fosoriales que adicionalmente son altamente especializadas (*P. lineola*, *P. orchimelas*, *P. orchileucos*) (Parra-Olea, 2002). El grupo *P. gadovi* incluye habitantes de alta montaña, conteniendo especies terrestres con cuerpos robustos alargados, colas largas, así como miembros relativamente cortos. Este grupo está geográficamente restringido, pero pobremente apoyado e incluye especies que ocurren a lo largo del Eje Neovolcánico Transversal: *P. altamontana*, *P. longicaudata*, *P. robertsi*, *P. anitae*, *P. cochranae*, *P. gadovii*, *P. melanomolga*, *P. tenchalli*, *P. expectata*, *P. goebeli*, *P. rex*, y *P. brunndata* (Parra-Olea, 2002).

Por último, el grupo *P. bellii* está formado por dos complejos de especies, el complejo *bellii* y el complejo *cephalica*. En un intento por resolver parte del complejo, Parra-Olea et al. (2005) analizaron exclusivamente al complejo *P. bellii*. Dentro de éste muestrearon todos los taxones incluyendo el intervalo de distribución de sus poblaciones y generaron secuencias de DNA mitocondrial (DNAMt) para proponer una hipótesis de las relaciones filogenéticas. En dicho análisis encontraron una estructura genética a nivel geográfico, y con cierta correspondencia con las características morfológicas, logrando en cierta medida resolver las relaciones del grupo, el cual quedó compuesto por las siguientes especies: *P. gigantea*, *P. naucampatepetl*, *P. bellii bellii*, *P. b. sierraoccidentalis*, *P. boneti* y *P. maxima*. La diversidad de especies encontrada en este estudio fue mayor que la anteriormente registrada.

Finalmente, para poder entender más sobre la diversificación de *Pseudoeurycea* es necesario analizar el complejo *Pseudoeurycea cephalica*. En referente a los considerados taxones de *P.cephalica* y sus subespecies que integran el complejo, encontramos que existen inconsistencias sobre las descripciones y las localidades que se toman en cuenta para su delimitación, derivado de ello, existen muchas preguntas por resolver sobre el *status* taxonómico de las especies contenidas en éste para esclarecer el *status* taxonómico del complejo. Con el afán

de aclarar las incertidumbres alrededor de este complejo, se presentan los datos de manera cronológica:

- Cope 1865: describió a *Spelerpes cephalicus* (= *Pseudoeurycea cephalica*) designando como localidad tipo a la “Meseta Central de México”. En un error tipográfico, el nombre que uso para la descripción de *S. cephalicus* fue en realidad *P. lineolus*. Posteriormente, el ejemplar tipo de Cope se pierde.
- Smith y Taylor, 1948: Designan neotipo para “Mexican Tableland” con una distribución para la especie en Veracruz, Puebla, Morelos y Estado de México.
- Taylor y Smith, 1950: restringen la localidad tipo para “2 millas al este de Rio Frio, Puebla.

En cuanto a las subespecies de *P. cephalica*:

1. *Pseudoeurycea cephalica cephalica* Taylor (1944) esta especie la incluye dentro del grupo *cephalica*.
2. *Oedipus manni* fue descrita por Taylor (1939) asignando localidad tipo en “Guerrero, Hidalgo” y paratipos de “Cerca de Zacualtipan, Hidalgo”. Smith y Taylor (1948) reconocen a este taxón como subespecie de *P. cephalica*.
3. *Bolitoglossa cephalica rubrimembris* fue descrita por Taylor y Smith en 1945. Estos autores asignan la localidad tipo a Santa Anita, Hidalgo y paratipos de Minas Viejas, y Zacualtipan, Hidalgo. Smith y Taylor (1948) reconocen a este taxón como subespecie de *P. cephalica*.

Parra-Olea (2002) realizó un estudio para proponer una hipótesis de relaciones filogenéticas del género *Pseudoeurycea*. En dicho trabajo, la autora reportó una alta divergencia genética entre dos poblaciones de *P. cephalica*. Posteriormente, Parra-Olea et al. (2004) describieron a la especie *Pseudoeurycea quetzalanensis* basándose únicamente en datos morfológicos e indicando su cercanía filogenética con *P. cephalica*. En 2010, Parra-Olea y colaboradores describieron una especie más, *Pseudoeurycea cafetalera*, a partir de un análisis con secuencias de mtDNA; en este último los autores mencionan que la divergencia genética entre las especies del complejo *cephalica*, incluyendo las dos especies que habían descrito

anteriormente, era muy alta, además de que es grupo hermano del complejo *P. bellii* (Parra-Olea et al., 2010)

Con base en esos trabajos, el complejo *Pseudoeurycea cephalica* está conformada por cinco especies válidas: *P. cephalica*, *P. galeanae*, *P. scandens*, *P. cafetalera* y *P. quetzalanensis*. A su vez, *P. cephalica* contiene a tres subespecies; *P.c. cephalica*, *P. c. rubrimembris* y *P. c. manni*. La distribución de las especies del complejo va desde los 1000 msnm en bosques nublados hasta bosques de pino-encino a lo largo del Eje Neovolcánico Transversal y la Sierra Madre Oriental. En particular la especie *Pseudoeurycea galeanae* es terrestre y ocurre en localidades del norte de México, en el estado de Nuevo León; la especie cavernícola *P. scandens*, se distribuye en el estado de Tamaulipas; *Pseudoeurycea quetzalanensis*, que es una especie semiarbórea se encuentra en el bosque nublado en la Sierra Madre Oriental, en el estado de Puebla. La especie terrestre, *P. cafetalera* se localiza en Veracruz al noroeste de la Sierra Zongolica (Parra-Olea et al., 2005; 2010) y *P. cephalica sensu lato* (subespecies; *P.c. cephalica*, *P. c. manni* y *P. c. rubrimembris*) se distribuyen en las tierras altas del centro de México (Uribe-Peña et al., 1999), a lo largo del Eje Neovolcánico Transversal y Sureste de la Sierra Madre Oriental. Esta especie se asocia a bosques de pino, pino-encino y bosques de *Abies* distribuidas en altitudes cercanas a los 2000 msnm.

Los estudios parciales que han sido publicados hasta este momento y una serie de datos aún no publicados para muchas especies de pletodóntidos (Parra-Olea, 2002; Parra-Olea et al., 2004; Mueller et al., 2004; Parra-Olea et al., 2005; Kozak et al., 2006; Zhang y Wake, 2009; Rovito, 2010; Parra-Olea et al., 2010; Rovito et al., 2012), indican que todavía existen especies no descritas, muchas de estas nuevas especies por descubrir quizá se encuentren dentro del complejo *P. cephalica*. Basados en la premisa de que la sistemática molecular ha ayudado a resolver las relaciones filogenéticas en diferentes grupos de pletodóntidos, y que el uso de esta herramienta ha contribuido a robustecer el conocimiento de los límites entre especies, nos planteamos para este trabajo los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

Proponer una hipótesis de las relaciones filogenéticas para las especies del complejo de salamandras pletodóntidas *Pseudoeurycea cephalica*, con base en secuencias de fragmentos mitocondriales y genes nucleares.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer la composición específica del complejo *Pseudoeurycea cephalica*.
2. Corroborar el *status* de las subespecies que componen el complejo *Pseudoeurycea cephalica*.
3. Identificar nuevos taxones con base en los resultados de los análisis moleculares.

MATERIAL Y MÉTODOS

Búsqueda bibliográfica

Utilizando la base de datos del portal web HerpNET se realizó una búsqueda de ejemplares recolectados y depositados en museos con el único objetivo de ubicar sitios para realizar la colecta de los individuos de este estudio, las localidades tipo se ubicaron a través de los escritos de Taylor 1938, Taylor y Smith de 1945 y 1950 (Fig. 1).

Muestras

Todas las muestras de este estudio fueron colectadas para efectos de este trabajo. 69 individuos pertenecientes al complejo de *Pseudoeurycea cephalica* en un total de 26 localidades a lo largo de su área de distribución. Las muestras fueron conservadas en etanol al 100% y en RNA later (solución estabilizadora de la marca Ambion). Adicionalmente, se incluyeron 17 individuos que ya habían sido colectados previamente por el laboratorio (Fig. 1, Tabla 1).

Trabajo de laboratorio

La extracción se efectuó para 86 muestras incluyendo las especies del complejo *Pseudoeurycea cephalica* y se utilizó como grupo externo a las especies *Pseudoeurycea rex*, *Pseudoeurycea gigantea*, *Pseudoeurycea boneti*, *Pseudoeurycea sierraoccidentalis*, *Pseudoeurycea scandens* y *Pseudoeurycea galeanae*. La extracción se realizó con el Kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), con base en el protocolo propuesto por el proveedor.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) se utilizó para amplificar los fragmentos de regiones mitocondriales y nucleares, con un termociclador Eppendorf Mastercycler gradient y Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler.

Los fragmentos de los genes mitocondriales se amplificaron con los oligos que abarcan parte del 12S hasta el ND1 descritos por Zhang y Wake (2009):

1) L2: LX12SN1 5'-TACACACCGCCCGTCA-3' y LX16S1R 5'-GACCTGGATTACTCCGGTCTGAACTC-3' de aproximadamente 1600 pares de bases (pb) que abarcan una parte de la región 12S, tRNA = Valina y todo el 16S.

2) A: LX16S1 5'-GGTTTACGACCTCGATGTTGGATCA-3' y Met3850H 5'-GGTATGGGCCCAARAGCTT-3' de aproximadamente 1500 pb, que abarcan la región mitocondrial ND1 y tRNA; Leusina, Isoleucina, Glutamina y Metionina.

Los genes nucleares utilizados en este estudio fueron el gen activador de la recombinación (RAG1), el gen nuclear encargado del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el gen de la proopiomelanocortina (POMC). Estos genes fueron considerados por las siguientes razones: 1) son genes de codificación de proteínas de una sola copia, 2) varían en el grado de conservación y son adecuados para inferencia filogenética, 3) son ideales para estimaciones coalescentes (Vietes et al. 2007).

Para el gen de POMC se amplificaron 42 muestras del complejo *P. cephalica* y dos de su grupo externo, *P. rex*, *P. galeanae*, y *P. sierraoccidentales*. Estos genes fueron amplificados con los oligos descritos por Vietes et al. (2007): POMC_DRV_F1: 5' ATATGTCATGASCCAYTT YCGCTGGAA-3' y POMC_DRV_R1: 5'-GGCRTTYTTGAAWAGAGTCATTAGWGG-3' de aproximadamente 480 pb.

El RAG1, de un tamaño aproximado de 763 pb fue amplificado para 68 muestras del complejo *P. cephalica* y cuatro especies como grupo externo: *P. boneti*, *P. galeanae*, *P. scandens* y *P. rex*, con los oligos descritos por San Mauro et al. (2004): Amp-RAG1 F: 5'-AGC TGCAGYCARTACCAYAARATGTA-3' y San Mauro et al. (2005): Sal-RAG1.R1 5'-AGGTTCTCAGTGTGGCTCCTGGTGA-3'.

Para el gen nuclear BDNF, de aproximadamente 700 pb, se amplificaron 41 muestras del complejo *P. cephalica* y tres especies como parte del grupo externo: *P. rex*, *P. sierraoccidentalis* y *P. galeanae* con los oligos descritos por Vietes et al. (2007): BDNF_DRV_F1: 5'-ACCATCC TTTTCCTKACTATGG-3'; BDNF_DRV_R1: 5'-CTATCTTCCCCTTTTAATGGTC-3'.

Para los productos de PCR del fragmento mitocondrial L2 y de los fragmentos nucleares POMC y RAG1 se llevó a cabo la purificación de las muestras por columnas centrisep de la

marca Life a través de la Separación Farmacia Dextran (Sephadex), con base en el protocolo descrito por QIAquick (Qiagen, Valencia, CA, USA) y CONCERT (Life Technologies, Paisley, UK). Se utilizó también el producto de limpieza EXOSAP con 1 µl diluido a 1:5 de ExoSAP-IT para 10 µl de producto de PCR incubado por 30 minutos a 37°C y después 15 minutos a 80°C (USB Corporation, Cleveland, OH, USA) en un termociclador Eppendorf Mastercycler gradient o Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler. Los protocolos para amplificar tanto los genes nucleares como los genes mitocondriales en PCR se describen en las tablas 2 y 3, donde se especifican las temperaturas para la reacción de secuenciación y protocolos utilizados. Tanto las extracciones, productos de PCR de los genes nucleares y mitocondriales, así como las purificaciones fueron observadas en geles de agarosa al 1% con un marcador de peso molecular de 10,000pb.

La reacción de secuenciación se realizó en el termociclador Eppendorf Mastercycler gradient o Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler, siguiendo el protocolo de ABI PRISM Big Dye Terminator v3.1 Cycle sequencing kits (Applied Biosystems, Foster, CA). La secuenciación de L2, POMC, RAG-1 se llevó a cabo en un secuenciador automático de capilar, modelo ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems) del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Finalmente, los productos de PCR de los fragmentos mitocondriales amplificados por los oligos A y los fragmentos nucleares BDNF, así como algunas muestras que se volvieron a amplificar y faltaban de RAG-1, POMC y L2, se enviaron al servicio de secuenciación del High-Throughput Genomics Unit en Seattle, Washington, USA, donde se analizaron con un secuenciador ABI Prism 3730xl (Applied Biosystems).

Análisis de secuencias

La corrección, análisis y ensamble de las secuencias obtenidas se llevó a cabo en el programa Sequencher 4.5. (Gene-Codes, Ann Arbor, MI, USA) y el alineamiento con el programa MUSCLE 3.8.31. (Edgar, 2004). Para la edición, visualización y corrección se utilizó el programa Mesquite 2.75 (Maddison y Maddison, 2011).

Análisis de datos

Las inferencias filogenéticas se realizaron únicamente con el análisis Bayesiano, ello porque las simulaciones sugieren que la máxima verosimilitud y la inferencia bayesiana generalmente dan mejores resultados que máxima parsimonia o de métodos de distancia para muestras que no tienen datos completos (Yang y Rannala, 2012). Aunque el modelo bayesiano y máxima verosimilitud utilizan una función de verosimilitud, difieren ya que los parámetros en máxima verosimilitud son fijadas como constantes desconocidas y el modelo bayesiano toma estos parámetros como variables aleatorias con distribuciones estadísticas, e implementa un algoritmo que usa números aleatorios para realizar la búsqueda con el algoritmo de la Cadena Monte Carlo de Marcov (MCMC). Así, la probabilidad posterior de un árbol es simplemente la probabilidad del árbol correcto (Yang y Rannala, 2012), que en este caso por la naturaleza de nuestros datos resuelve mejor la inferencia filogenética.

Los análisis Bayesianos se realizaron en el programa MrBayes 3.1.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003), con un número de corridas de 20,000,000 de repeticiones con 2 Cadenas Monte Carlo de Marcov (MCMC) con una la frecuencia de muestreo de 1000, en el portal de internet CIPRES (Miller et al., 2010).

Partición de genes

Al realizar particiones de los datos moleculares se tiene la ventaja de inferir diferentes tasas de sustitución nucleotídica para caracterizar los sitios, ya que algunos de los genes que estamos utilizando provienen de una región codificante y la selección natural (selección purificadora) puede estar influyendo para que exista variabilidad genética en algunos sitios más que en otros y además estos sitios pueden exhibir diferentes tasas de evolución (Pagel y Meade, 2004).

Las particiones se realizaron tomando los genes individualmente y en conjunto, tanto los mitocondriales como los nucleares. Para los genes codificantes (ND1, BDFN, POMC y RAG1) las particiones se llevaron a cabo de acuerdo a la posición del codón para la síntesis de aminoácidos ya fuera en la primera, segunda o tercera posición determinada en el programa Mesquite 2.75. Se estimó el modelo de sustitución para cada estrategia con el programa MrModeltest 2.3. (Nylander, 2004). Dado que se realizaron muchas particiones al considerar la

tasa de sustitución para genes codificantes, esto incrementa la cantidad de datos dentro de cada partición, y da como resultado el incremento del error aleatorio asociado con los parámetros del modelo de estimación, para esto se evaluó la mejor partición con el factor Bayes. Éste es un método para determinar si una estrategia específica de partición es superior a otra y evaluar la compensación del incremento sobre el número de particiones, minimizando el error aleatorio (Bradley et al. 2005). El factor Bayes usa la media armónica de verosimilitud generada en MrBayes donde el cambio de posibilidades de la probabilidad anterior a la posterior arroja un esquema de certidumbre que favorece una hipótesis (Rovito, 2010; Bradley et al., 2005). Las estrategias de partición fueron consideradas para los genes mitocondriales, genes nucleares, en conjunto y todos los genes concatenados.

Los resultados obtenidos de la generación de los árboles con respecto a cada partición para cada gen con los análisis Bayesianos se observaron con el programa TRACER 1.5 (Rambaut y Drummond, 2003), para determinar cual fue la mejor estrategia de partición. Asimismo, se calculó el factor Bayes que tiene que ser cercano o mayor de uno y la desviación estándar cercana a cero, lo que indicaría el apoyo de los datos bajo la consideración de la hipótesis (McCormack et al., 2011; Bradley et al., 2005). Por ello, solo tomamos en cuenta el árbol que arrojó un LnP cercano a 1, descartando los árboles con las otras particiones.

Inferencia filogenética

1.1 Genes mitocondriales

Para la base de datos de los fragmentos mitocondriales que en conjunto incluye las cuatro regiones (12S, 16S, tRNA y ND1) se tomaron en cuenta tres particiones y para cada una se generó un árbol (ver Tabla 4). Con base en el valor de probabilidad posterior se eligieron los siguientes tres análisis para evaluar las hipótesis filogenéticas:

- I) Análisis con todos los datos mitocondriales juntos con seis particiones
- II) Los genes mitocondriales ribosomales (12S y 16S) y los tRNA con tres particiones
- III) Análisis con datos del gen ND1 con tres particiones

1.2 Genes nucleares

Para los genes nucleares las particiones se establecieron después de utilizar el programa PHASE (Stephens et al., 2001) para estimar el más probable par de alelos en individuos heterocigotos identificados en cada secuencia de los genes nucleares con el programa PHASE (Stephens et al., 2001) y posteriormente se establecieron las particiones. Se estimó también la recombinación en genes nucleares con el programa HyPhy, en el bioportal llamado DATAMONKEY (Kosakovsky y Frost, 2005) dentro del análisis de puntos de interacción individual (SBP) (Kosakovsky-Pond et al., 2005a, 2005b, 2006; Wayne et al., 2010). Se utilizó este modelo debido a que usa un algoritmo genético para buscar en un alineamiento de secuencias múltiples, encontrando puntos de quiebre en recombinaciones putativas, cuantificando el nivel de apoyo de ese sitio en particular, e identificando secuencias (o incluso clados) que están relacionados con eventos de recombinación putativa. Con esto es posible proponer muchas filogenias que pueden tener un modelo correcto de evolución de fragmentos no recombinantes (Kosakovsky-Pond et al., 2006). En la Tabla 4 se presentan los valores de probabilidad posterior por cada partición.

Con base en el valor de probabilidad posterior se eligieron dos análisis para evaluar las hipótesis filogenéticas:

- IV) Análisis de cada gen por separado, con tres particiones.
- V) Análisis con los tres genes concatenados, con nueve particiones

1.3 Evidencia total

Se concatenaron los genes mitocondriales y nucleares para poder establecer si la información recabada podría apoyar mejor la hipótesis filogenética del complejo, ya que simulaciones muestran que cuando se combinan tres loci con más de tres copias genéticas por linaje es suficiente para recobrar un árbol de especies (McCromack et al., 2010). La mejor estrategia fue con 15 particiones.

De todos los árboles generados para los genes mitocondriales, nucleares, así como el de evidencia total sólo se tomó en cuenta el árbol con mejor estrategia de partición y estos fueron observados con el programa FigTree v1.3.1 (Rambaut, 2006).

Las distancias genéticas dentro de los clados se calcularon en el programa MEGA 5.1 (Tamura et al., 2011).

1.4 Delimitación de los taxones

Abordar el concepto de especie puede ser problemático debido a que ha existido un gran debate acerca del tema por siglos (Wiens et al., 2000; De Queiroz, 2007). De Queiroz (2007) propuso la unificación del concepto de especie de acuerdo a la problemática, sus propiedades, el criterio de operación y las líneas de evidencia que se tienen para poder esclarecer los límites y número de especies. Consideramos así que uno de los conceptos de especie más apropiados para este estudio es concepto filogenético de especie; éste establece que una especie es un agrupamiento de individuos dentro del cual se tiene un patrón de ancestría-descendencia en unidades que forman un grupo monofilético. También es muy útil el concepto de especie basado en linajes dentro de los cuales existe una separación involucrando linajes o segmentos de metapoblaciones (De Queiroz, 2007; Hausdorf, 2011). Estos conceptos son considerados para abordar la problemática en el establecimiento de los límites entre especies del complejo *P. cephalica*.

RESULTADOS

El muestreo incluyó 26 localidades de las cuales siete corresponden al estado de Veracruz, seis de Puebla, cinco para Hidalgo, dos para el Distrito Federal y dos para Querétaro, así como una para cada uno de los siguientes estados: Tamaulipas, San Luis Potosí, Morelos y Estado de México. Las 26 localidades abarcaron prácticamente la totalidad de la distribución del complejo como se muestra en la Tabla 1 y la fig. 1.

Información genética

Genes mitocondriales

Debido al tamaño del fragmento de los tRNA y 12S, estos se analizaron en conjunto. El tamaño del fragmento amplificado para 12S no fue completo y solo incluyó 67 pb para 75 muestras amplificadas y el número de sitios invariables fue 0. Para los tRNA se amplificaron 276 pb para 85 muestras y no se encontró ningún sitio invariable. La mayor proporción fue de Adenina (A) con 34.57% y la tasa de sustitución más alta fue de 23.86 para C/T (Tabla 5).

Para el 16S se obtuvo un tamaño de 1533 pb para 83 individuos. La proporción de sitios invariables fue de 25.72%. La presencia del nucleótido A obtuvo el porcentaje más alto con 39.14%; el valor que sobresale entre transiciones/ transversiones fue de C/T con 33.42% con un valor de R que es la tasa de sustitución $([A * G * k_1 + T * C * k_2] / [(A + G) * (T + C)]) = 1.632$ y un valor alto en el cambio de Pirimidinas ($K_2 = 7.405$) comparado con el de Purinas ($K_1 = 0.576$) (Tabla 6).

Para el ND1 se amplificaron 971 caracteres para 79 individuos, de los cuales el 56.54% presentó sitios invariables. Se obtuvo una mayor proporción de A (34.76%); el valor más alto entre transiciones/ transversiones fue de C/T con 26.62%, con un valor de R = 3.783 y un valor alto en el cambio de Pirimidinas ($K_2 = 9.808$) comparado con el de Purinas ($K_1 = 6.185$) (Tabla 7).

Genes nucleares

El tamaño de fragmento RAG-1 fue de 762 caracteres. Con el análisis de SBP de la prueba de recombinación realizado en el portal datamonkey, el criterio de Akaike (AIC) arrojó un positivo

de recombinación por lo que se procedió a remover el fragmento de alrededor de 262 pb que era recombinante para poder realizar una más robusta inferencia filogenética. Se amplificaron 66 muestras dentro de las cuales el programa PHASE identificó 44 posibles haplotipos; al final del análisis se consideraron 110 muestras junto con los posibles haplotipos encontrados. Se obtuvo un total de 54.4% sitios invariantes con una mayor proporción de A (26.95%); el valor más alto entre transiciones/ transversiones fue de C/T con 22.61% con un valor de $R= 2.085$ y un valor alto en el cambio de Pirimidinas ($K_25.328$) comparado con el de Purinas ($K_13.073$) (Tabla 8).

Para el POMC se obtuvieron 518 pb. Para el análisis de SBP de la prueba de recombinación realizado en el portal datamonkey, el criterio de Akaike (AIC) arrojó un valor negativo para la recombinación. Se analizaron 40 individuos con 22 haplotipos identificados con el programa PHASE, obteniendo un total de 62 muestras para analizar. El número de sitios invariantes fue de 44% y la mayor proporción nucleotídica fue de A (32.01%); el valor más alto entre transiciones/ transversiones fue de T/C con 25.41% con un valor de $R= 1.11$ y un valor alto en el cambio de Pirimidinas ($K_24.391$) comparado con el de Purinas ($K_11.15$) (Tabla 9).

Para el BDNF se obtuvieron 707 pb. Para el análisis de SBP de la prueba de recombinación realizado en el portal datamonkey, el AIC criterio arrojó un negativo. El número de individuos amplificados fue de 40 y se identificaron 15 haplotipos identificados por el programa PHASE, finalizando con 55 posibles por analizar. Se encontró un 68% de sitios invariantes y la mayor proporción de C (28.2%); el valor más alto entre transiciones/ transversiones fue de T/C con 16.34% con un valor de $R= 1.604$ y un valor alto en el cambio de Pirimidinas ($K_23.462$) comparado con el de Purinas ($K_12.944$) (Tabla 10).

Análisis filogenéticos

Datos mitocondriales

Se realizaron tres análisis con los fragmentos de los genes mitocondriales que incluyen: un análisis con todos los fragmentos amplificados, un análisis donde concatenaron los genes 12S, 16S y tRNA y por último, un análisis con el gen ND1 que se analizó independientemente.

I) El análisis de los genes mitocondriales combinados arrojó un árbol cuya topología incluye siete clados (Fig. 2). El Clado I está compuesto por las muestras de las localidades de San José y Rancho El Cielo en Tamaulipas, teniendo a *P. galeanae* como grupo hermano. El Clado II incluye ejemplares de las localidades de La Pingüica en Querétaro y La Trinidad en San Luis Potosí. El Clado III contiene muestras del Parque Nacional los Mármoles, en el estado de Hidalgo. El Clado IV está compuesto por ejemplares de las localidades de Zacualtipan, Zoquizoquipan en Hidalgo y Zilacatipan en Veracruz. El Clado V esta constituido por las muestras de *P. cafetalera*, que incluyen las localidades tipo con poblaciones de La Joya y Huatusco en el estado de Veracruz; el clado VI, incluye aquellas de la localidad de Cruz Blanca, Veracruz y Ahuazotepec en Puebla. Finalmente, el clado VII que contiene muestras de *P. quetzalanensis*, de las localidades de Xocoyolo y Hueyapan en el estado de Puebla y el resto de las muestras de *P. cephalica* del Eje Neovolcánico Transversal en Hidalgo, Puebla, Estado de México y Distrito Federal.

II) El análisis de los genes mitocondriales concatenados 12S, 16S y tRNA se realizó con base en tres particiones (Fig. 3). El árbol generado confirma los clados I, II, III, y IV del análisis mitocondrial completo como puede observarse en la figura. En este análisis, *P. cafetalera* se anida dentro un clado mas grande (sin apoyo) que contiene a los componentes de los clados V, VI y VII del primer análisis.

III) El análisis del gen ND1 se realizó con base en tres particiones y el árbol resultante se muestra en la Figura 4. Este análisis recupera siete clados que se formaron al analizar la matriz combinada de todos los genes mitocondriales (clados I al V, Fig 2), y se presenta una mejor resolución en la base del árbol. Este análisis apoya la existencia de *P. cafetalera* y *P. quetzalanensis* como unidades independientes de *P. cephalica*.

Datos nucleares:

Los genes nucleares que fueron considerados en este trabajo se analizaron cada uno de manera independiente y después se realizó un análisis concatenado

El análisis con RAG-1 resultó en un árbol en donde se recuperan tres clados (Fig. 5). El Clado A contiene a un grupo de secuencias que se anidan junto con *P. galeanae* y que

corresponden con los clados I y II del análisis mitocondrial. El clado B incluye a uno de los grupos externos (*P. boneti*) junto con *P. quetzalanensis* y, finalmente, un clado mas grande (Clado C) que contiene un subclado, que agrupa a las poblaciones de Hidalgo, y Veracruz (clados III y IV de mitocondrial). Todas las muestras del Eje Neovolcánico transversal forman una politomia basal. En este análisis las muestras de *P. quetzalanensis* son grupo hermano del clado C. Cabe hacer notar que las dos muestras analizadas de *P. quetzalanensis* se incluyen en dos clados diferentes, en el clado B y como grupo hermano del clado C.

En el análisis de POMC (Fig 6) se obtuvo un árbol que recupera cinco clados. Los clados I y II mitocondriales; el clado F que contiene a los clados III y IV mitocondriales. En este análisis otro grupo externo, *P. sierraoccidentalis* se anida dentro del grupo interno, agrupándose con una muestra del estado de Veracruz formando el clado E. Finalmente todas las muestras del Eje Neovolcánico Transversal, *P. quetzalanensis* y *P. cafetalera* forman el clado G.

El árbol con BDNF (Fig. 7) recupera los clados mitocondriales I y II, aunque éstos forman una politomía basal con *P. galeanae* (Clado A). Los clados mt III y IV constituyen a su vez un solo clado (Clado D), así como los clados mt V y VI también forman un solo clado (clado E).

Datos nucleares concatenados

Se concatenaron todos los genes nucleares para interpretar la información con base en un mayor número de caracteres y de esta manera tener un mayor apoyo para explicar la topología que se genera a partir de éstos. El resultado muestra un árbol donde se observan tres grandes grupos, que a su vez, pueden ser interpretados con base a la distribución geográfica del complejo (Fig. 8). Un grupo del norte (Clado Norte) que incluye a *P. galeanae* y a los clados I y II generados con datos mitocondriales. Un grupo central (Clado Centro) que contiene a su vez con los clados III y IV del análisis mitocondrial y, por último, un clado sureño (Clado Sur) que incluye clados V, VI y VII del análisis mitocondrial. Asimismo, el análisis concatenado de los genes nucleares agrupa a las especies *P. boneti* y *P. sierraoccidentalis* dentro del clado del sur, el cual también incluye *P. cafetalera*, *P. quetzalanensis* y a las muestras de *P. cephalica* que fueron obtenidas de diferentes localidades del Eje Neovolcánico Transversal.

Evidencia total

En un último análisis, se consideraron tanto los genes nucleares como todos los fragmentos de los genes mitocondriales (12S,16S, RNAt, ND-1, RAG-1, BDNF y POMC) para realizar un análisis de evidencia total. De esta manera, se analizaron todos los genes mitocondriales y nucleares juntos (12S, 16S, RNAt, ND-1, RAG-1, BDNF y POMC) y además se encontró que la mejor estrategia de partición fue la realizada para cada uno de los genes y posición de codón (15 particiones -20220.214 +/-0.473). Este análisis, que se presenta en la figura 9, generó un árbol cuya topología es básicamente similar a la del árbol generado al analizar exclusivamente al gen ND1, con una buena resolución basal y destacando la existencia de los taxones que habían sido ya reconocidos con base en caracteres morfológicos. Asimismo, en este análisis de evidencia total se confirman los siete clados generados de los análisis con fragmentos mitocondriales y además, se presenta una topología que tiene correspondencia geográfica. Adicionalmente, se confirma la identidad de *P. cafetalera*, y *P. quetzalanensis* como especies independientes.

DISCUSIÓN

En este estudio, la utilización de datos mitocondriales y nucleares permitió generar una propuesta de relaciones filogenéticas entre las diferentes especies del complejo *P. cephalica*. Además de arrojar grupos monofiléticos particulares (con buen apoyo de ramas a través de valores de probabilidad posterior), mostró una estructura geográfica de los clados para el árbol de especies.

Las inferencias filogenéticas realizadas para los genes mitocondriales y nucleares, por separado, reflejaron diferentes tipos de agrupamientos en los clados encontrados para cada gen. Los mitocondriales concatenados arrojaron siete clados al igual que en el ND1. El análisis de los genes mitocondriales 12S, 16S y RNAt reflejó cinco clados. Para los análisis de genes nucleares concatenados podemos ver tres clados, en el RAG-1 cuatro clados, POMC cinco clados y BDNF tres clados.

Esta diferencia y en algunos casos la incongruencia que existe en los clados encontrados, puede deberse a que los genes mitocondriales tienen una tasa de mutación más rápida que los genes nucleares así como un mayor número de caracteres informativos. Otro factor es la historia genética poblacional, los eventos como el sorteo de linajes incompletos y el flujo génico dentro de las poblaciones pueden influir en la incongruencia de las inferencias filogenéticas para los diferentes genes nucleares y mitocondriales analizados por separado (Fisher-Reid y Wiens, 2011; Wiens y Servedio, 2000).

En este sentido, podemos observar que cada uno de los genes varía con respecto a el número de clados. En los genes nucleares existe un patrón geográfico general, observando tres grandes clados de norte a sur, por otro lado los clados mitocondriales tienen una diferenciación geográfica marcada que concuerda con los patrones de la distribución del complejo *P. cephalica* y resalta por encima de los clados nucleares.

Tomando en cuenta las diferencias existentes, los datos combinados incrementan la posibilidad de recuperar un árbol de especies (McCromack et al., 2010), la discusión acerca del uso de los datos combinados y las consecuencias de ello ha sido pocas veces explorado (Fisher-Reid y Wiens, 2011). En nuestro análisis combinado recuperamos clados que no se muestran en los análisis mitocondriales o nucleares por separado. El incremento de la información genética

para estos dos tipos de datos amplió la posibilidad de recuperar un mayor número de clados. El realizar este tipo de análisis combinado ha sido discutido por si existe un mayor impacto de los genes mitocondriales sobre los nucleares o a la inversa. Fisher-Reid y Wiens, 2011 observaron que en la mayoría de los casos de los árboles combinados, el árbol de especies es similar al árbol de datos nucleares más que de los árboles generados con datos mitocondriales, esto puede ser por la influencia del número de caracteres y el peso de éstos. Dentro de nuestros análisis, aunque no existió una concordancia respecto al número de clados para los diferentes genes, sí se trato de equiparar el número de caracteres tanto nucleares como mitocondriales.

El árbol combinado representa nuestro árbol de especies tomando en cuenta el concepto filogenético de especie y el concepto de especie basado en linajes (De Queiroz, 2007; Hausdorf, 2011) para delimitar los taxones. Nuestros resultados arrojan que el árbol combinado del complejo *P.cephalica* forman clados bien diferenciados. Sin embargo es necesario realizar análisis de coalescencia y de inferencias genéticas poblacionales para poder explicar el comportamiento de los genes estudiados con respecto a los taxones encontrados. Wiens y Servedio, 2000 discuten sobre la importancia de realizar análisis que incluyan patrones de la historia demográfica, geográfica y genética poblacional de los taxones estudiados.

Historia y clados del complejo *Pseudoeurycea cephalica*

Dentro del panorama que engloba el complejo, resulta claro que no está bien definida la situación de las especies y subespecies que han sido reconocidas tradicionalmente en estudios basados fundamentalmente en caracteres morfológicos. Conceptualmente las subespecies pueden ser definidas como poblaciones que muestran una diferenciación genética y a menudo son geográficamente y morfológicamente distintas de otras poblaciones (Laurence et al., 2011). La designación (y el reconocimiento) de subespecies normalmente se ha visto como una actividad arbitraria (Laurence et al., 2011).

En general, las salamandras bolitoglossinas carecen de caracteres morfológicos específicos por los procesos de convergencia que éstos presentan; las especies de *P. cephalica* no son la excepción. Es frecuente encontrar altas divergencias genéticas entre las especies morfológicamente similares que conforman al género *Pseudoeurycea* (Parra-Olea, 2002). Por ejemplo, Parra-Olea et al. (2005) registraron divergencias genéticas más altas en el Cytb de hasta

un 14.78% entre las especies del complejo *P. bellii* y Parra-Olea (2002) registró divergencias de hasta un 13% en Cytb en las poblaciones de *P. leprosa*.

Con ello las descripciones taxonómicas y localidades que existen para todas las sinonimias de *P.cephalica* resaltan la importancia de esclarecer la composición de taxones que existen dentro del complejo. En un primer acercamiento Dunn consideró a todos los urodelos bolitoglosinos en el género *Oedipus*. Esta generalización provocó que él usara el nombre de *sulcatus* porque era el único disponible y en el cual cayó el complejo *cephalica* (Brame, 1963). Después utiliza *Oedipus* para todas las salamandras que son afines a *leprosus*, *belli*, *variegatus*, etc. (Dunn, 1918). En 1924 realizó una clave taxonómica para el género *Oedipus* y a lo que el nombró como *Oedipus leprosus* lo reconoce en este trabajo como *cephalicus*.

Taylor en 1938 (1939) menciona que el tipo de Cope, 1865 se perdió y algunas de las especies listadas por Dunn (1926) aparentemente pertenecen a otras especies. El rango de la colección que analiza Taylor abarca 15 especímenes que provienen de: Hidalgo, región central de Veracruz, Morelos y Puebla. Como parte de este análisis describe a *Oedipus manni*, los ejemplares utilizados en esta descripción tienen el mismo número de catalogo que los ejemplares de Dunn, (1918) mencionados como *Oedipus cephalicus*.

Taylor realiza en el trabajo de 1944, muchos arreglos taxonómicos y dentro de ellos propone el género nuevo *Pseudoeurycea* en donde menciona al grupo *cephalica*, que contiene a: *Pseudoeurycea galeanae* (Taylor), *Pseudoeurycea cephalica cephalica* (Cope), *Pseudoeurycea cephalica manni* (Taylor) y *Pseudoeurycea cephalica rubrimebris* (Taylor y Smith). Con este trabajo se aclara parte de la posición taxonómica de algunas especies que conforman el complejo, pero menciona a *Spelerpes sulcatus* como *Species Incertae Sedis*, que después es sinonimizada por Bogert, 1967 con *P.cephalica*. Por otra parte Parra-Olea et al. 2010 menciona que encuentra una divergencia para las poblaciones de Querétaro. Raffaëlli, 2007 indica que probablemente existan más taxones en Tamaulipas y Querétaro.

Estos antecedentes corresponden con la congruencia geográfica que existe entre los clados del árbol de especies el Clado I con el grupo hermano *Pseudoeurycea galeanae* que corresponde a las localidades del Cielo perteneciente al estado de Tamaulipas, el Clado II,

proviene de localidades que se encuentran en los estados de Querétaro y San Luis Potosí, con ello se confirma la existencia de estos taxones para estas regiones.

Los clados que se generaron en el centro son más complejos, ya que Taylor y Smith en 1945 describen a *Bolitoglossa cephalica rubrimembris* con localidad tipo seis kilómetros al sur de Santa Anita, Hidalgo, México, con una elevación de 4,500 pies. Smith y Taylor en 1948, mencionan a la subespecie *Pseudoeurycea cephalica cephalica* y designan un neotipo para esta, perteneciente a Cruz Blanca, Veracruz, sin embargo no hay un cambio para la localidad tipo ya que sigue siendo la Meseta Central de México. En 1950 estos mismos autores designan, reafirman y reportan las localidades tipo para; *Pseudoeurycea cephalica cephalica*: 2 millas al este de Río Frío, Puebla, México, *Pseudoeurycea cephalica manni*: cerca del Mineral del Monte, Guerrero, Hidalgo, México y *Pseudoeurycea cephalica rubrimembris* seis kilómetros al sur de Santa Anita, Hidalgo, México (Ver Tabla 12).

En este sentido para el estado de Hidalgo encontramos dos linajes bien diferenciados, los clados mitocondriales III y IV. El primero incluye solo a la localidad de Parque Nacional Los Mármoles, al norte de Hidalgo, con un porcentaje de divergencia genética mitocondrial (ND1) de 2.2 % (K2-p) con respecto al clado IV. Smith y Taylor 1948 mencionan que el rango de distribución de *P.c.rubrimembris* incluye el norte de Hidalgo, la localidad analizada en este trabajo abarca esta región. El poder identificar y tener muestras de la localidad tipo ha sido complicado, pero podríamos decir que el clado III por cercanía con la localidad tipo de *P. c. rubrimembris* (Santa Anita, Hidalgo, ver Fig. 12) podría asignarse a éste taxón y una vez analizado morfológicamente podría identificarse como la especie *P. rubrimembris*.

El Clado IV que incluye las localidades de Zilacatipan en Veracruz, así como Zacualtipan y Zoquizoquipan en Hidalgo. Taylor y Smith (1948) mencionan que el rango de distribución de *P. c. manni* es el sur de Hidalgo, en este trabajo no se pudo obtener muestras de la localidad tipo, pero la localidad de las muestras colectadas representa el intervalo de distribución de la subespecie *P. c. manni*, por lo cual este linaje podría ser una especie independiente, que deberá referirse en lo sucesivo como *P. manni*, después de los análisis morfológicos correspondientes.

Para las especies recientemente descritas; *Pseudoeurycea cafetalera* (Parra-Olea et al. 2010) y de acuerdo con los análisis de este trabajo se agrupa en el clado V que incluye la localidad tipo (Rancho dos Puentes 6.0km), así como las localidades de Huatusco y La Joya en Veracruz. Asimismo, en el análisis de distancias genéticas mitocondriales ND1, esta especie alcanza 11% de divergencia con *P. quetzalanensis* y del 10.2% con *P. cephalica* (Tabla 11).

Para el clado del sur, el cual está compuesto por varias poblaciones a lo largo del Eje Neovolcánico Transversal en el Distrito Federal (Ciudad Universitaria, Los Ocotales y La Magdalena) así como aquellas que pertenecen a los estados de Morelos (Lagunas de Zempoala), Hidalgo (El Chico, Tejocotal), Veracruz (Huayacocotla), Estado de México (Chalma) y Puebla (Ahuazotepec, Chignahuapan y el Mirador) pertenecen a aquellas que describieron Taylor (1939-1938), Smith y Taylor (1945,1948) en particular para la especie *P. c. cephalica*. Destacamos que la localidad tipo para esta especie fue restringida por Taylor y Smith (1950) a Río Frío, en el estado de Puebla sin embargo no se cuenta con ninguna muestra de esta localidad. Observando que el rango de distribución y que muchas de las localidades que describen Smith y Taylor concuerdan con las muestras de este trabajo podemos decir que este clado puede ser asignado a *P. cephalica sensu stricto* no sin antes coleccionar y analizar morfológicamente un taxón de Río Frío, Puebla.

Finalmente, nuestros datos señalan la existencia de por lo menos 3 especies por describir (Fig. 9). Las primeras dos, están representadas en el Clado Norte, o bien Clado I formado por poblaciones de Tamaulipas que son grupo hermano de *P. galeanae*. La segunda especie es el clado II, el cual está formado por poblaciones de San Luis Potosí y Querétaro, el cual a su vez es grupo hermano del Clado I+*P. galeanae*. La tercera especie sería un linaje que se obtiene en el árbol de evidencia total como grupo hermano del clado del Sur. El clado VI está formado por las poblaciones de Cruz Blanca en Veracruz y Ahuazotepec en Puebla.

Acercamiento geográfico

La distribución geográfica del complejo *Pseudoeurycea cephalica* abarca un rango que incluye a los sistemas montañosos; Sierra Madre Oriental (SMO) y el Eje Neovolcánico Transversal (ENT) (Fig. 11). Algunos trabajos han resaltado la importancia de estas regiones como focos de endemismo y alta diversidad biológica como menciona Sanginés-Franco et al., 2011. Estos

autores realizaron un trabajo usando 66 especies de helechos leptosporangios para la Sierra Madre oriental, resaltando que estos son un componente básico y altamente diversos en diferentes gradientes vegetales de la Sierra Madre Oriental y el Eje Neovolcánico Transversal con ello identificó cinco áreas de importancia biológica; 1) Patrón suroriental generalizado que corre a lo largo de los límites de la SMO y ENT cruzando la cuenca del Río Pánuco entre Nuevo León y Tamaulipas 2) Patrón nororiental generalizado, comienza en la porción norte del estado de Coahuila y corre a lo largo del sur y final de área de Sierra Gorda en el estado de Querétaro 3) Patrón meridional generalizado, este corre a lo largo de la cuenca del Río Pánuco y el lado límite occidental de la SMO y conecta con ENT 4) Patrón generalizado del norte, este corre a lo largo de la parte norte de SMO y la parte central del Coahuila y nuevo León y 5) Patrón generalizado de Sierra Gorda localizado en la parte meridional del SMO siendo muy corto e incluye solo los estados de Hidalgo y Querétaro.

Podemos decir que existe una gran diversidad de salamandras pletodóntidas que son promovidas por los sistemas montañosos que convergen en la SMO y el ENT y quizá esto es un efecto provocado por las glaciaciones pleistocénicas, ya que existieron muchos refugios por esta zona geográfica como se ha visto en estudios con *P.leprosa* (Parra-Olea et al., 2005a; 2012; Velo- Antón et al., 2013). Resaltando, estos sistemas montañosos no solo favorecen la diversidad de pletodóntidos si no también de otros taxones (Domínguez-Domínguez y Pérez-Ponce de León, 2009; Ornelas et al., 2013).

Para el complejo *P.cephalica* el grupo norte incluye *P. galeanae*, misma que se distribuye en bosques de pino-encino de Nuevo León junto con las poblaciones de *P. cephalica* de Tamaulipas, San Luis Potosí y Querétaro. El grupo central incluye poblaciones de los estados de Hidalgo y Veracruz y, finalmente, el grupo del Sur incluye todos los taxones y poblaciones de *P. cephalica* hacia el sur de su distribución, incluyendo a las especies *P. cafetalera* de Veracruz, *P. quetzalanensis* de Puebla y además, todas las demás poblaciones distribuidas a lo largo del Eje Neovolcánico Transversal.

CONCLUSIONES

- Existe un patrón claro entre los clados generados por los análisis filogenéticos y la distribución geográfica de los taxones.
- De acuerdo al árbol de especies el clado norte, incluye poblaciones de Tamaulipas, San Luis Potosí y Querétaro los cuales se agrupan con *P. galeanae* y las poblaciones que forman el clado norte, podrían ser reconocidas como dos especies nuevas para la ciencia que deberán ser nombradas y apropiadamente descritas.
- El clado del centro está formado por dos subclados los cuales podrían ser asignados a lo que se reconoce como las subespecies de *P. cephalica* y después de un análisis integral que incluya morfología reconocerlas como especie: *P. manni* para la parte norte del clado en el área de Los Marmoles en Hidalgo y *P. rubrimembris* para las poblaciones de Hidalgo y Veracruz.
- Las especies *P. cafetalera* y *P. quetzalanensis* son recobradas en los análisis realizados como unidades evolutivas independientes.
- La especie *P. cephalica sensu stricto* puede ser asignada al clado formado por todas las poblaciones del Eje Neovolcánico Transversal.

BIBLIOGRAFÍA

- AmphibiaWeb. 2013. Information on amphibian biology and conservation. University of California, Berkeley. <http://amphibiaweb.org/>; última consulta: 8. II. 2013.
- Barraclough, G. T. y N. Sean. 2001. Phylogenetics and speciation. *Trends in Ecology y Evolution* 16: 391-399.
- Baird, I. L. 1951. An anatomical study of certain salamanders of the genus *Pseudoeurycea*. *University of Kansas Science Bulletin* 34: 221-265.
- Bogert, C. M. 1967. New salamanders of the plethodontid genus *Pseudoeurycea* from the Sierra Madre del Sur of Mexico. *American Museum Novitates* 2314: 1-27.
- Brandley, M. C., A. Schmitz, y T. W. Reeder. 2005. Partitioned Bayesian analysis, partition choice, and the phylogenetic relationships of scincid lizards. *Systematic Biology* 54: 373-390.
- Brame, A. H., Jr. 1963 "1962". Status of the plethodontid salamander *Spelerpes sulcatum* Brocchi, of México. *Herpetologica* 18: 241-245.
- Brocchi, P. 1883. Mission Scientifique au Mexique et dans l'Amérique Centrale. *Recherches Zoologiques. Troisième Partie, 2 Section. Étude des Batraciens de l'Amérique Centrale. Livraison 3* París: Ministère de l'Instruction Publique.
- Cope, E. D. 1865. Third contribution to the herpetology of tropical America. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 17: 185-198.
- De Queiroz, K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology* 56: 879-886.
- Domínguez-Domínguez O., G. Pérez-Ponce de León. 2009. ¿La mesa central de México es una provincial biogeográfica? Análisis descriptivo basado en componentes bióticos dulceacuícolas. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 80: 835-852.

Dunn E. R. 1918. The collection of Amphibia Caudata of the Museum of Comparative Zoology. *Bulletin of the Museum Comparative Zoology* 9:445-471.

Dunn, E. R. 1924. New salamanders of the genus *Oedipus* with a synoptical key. *Field Museum of Natural History Publication. Zoological Series* 12: 95-100.

Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5: 1-19.

Frost, Darrel R. 2013. *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 5.6 (9 January 2013). Electronic Database accessible at. <http://research.amnh.org/herpetology/amphibian/index.html> American Museum of Natural History, New York, USA; última consulta: 19. X. 2013.

Fisher-Reid M.C., John W. 2011. What are the consequences of combining nuclear and mitochondrial data for phylogenetic analysis? Lessons from *Plethodon* salamanders and 13 other vertebrate clades. *BMC Evolutionary Biology* 11:300.

Garman, S. 1884. The North American reptiles and batrachians. A list of the species occurring north of the Isthmus of Tehuantepec, with references. *Bulletin of the Essex Institute. Salem, Massachusetts* 16: 3-46

Guibé, J. 1950 "1948". *Catalogue des Types d'Amphibiens du Muséum National d'Histoire Naturelle Paris: Imprimerie Nationale.*

Hausdorf, B. 2011. Progress toward a general species concept. *Evolution* 65: 923-931.

HerpNET. 2013. National Biological Information Infrastructure. <http://herpnet.or/>; última consulta: 7. VII. 2010.

Kosakovsky, P. S. L. y S. D. W. Frost. 2005. Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics* 21: 2531-3

Kosakovsky-Pond, S. L., S. D. W. Frost. y S. V. Muse. 2005b. HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics* 21: 676-679.

Kosakovsky-Pond, S. L., D. Posada, M. B Gravenor, C. H Woelk y S. D. W. Frost. 2006. Automated Phylogenetic Detection of Recombination Using a Genetic Algorithm. *Molecular Biology and Evolution* 23: 1891-1901.

Kozak, H. K., D. W. Weisrock y A. Larson. 2006. Rapid lineage accumulation in a non-adaptative radiation: phylogenetic analysis of diversification rates in Eastern North American Woodland salamanders (Plethodontidae: Plethodon). *Proceedings of the Royal Society B* 273: 539-546.

Larson, A., D. Wake, y T. Devitt. 2006. The Tree of Life. Caudata. Salamanders. <http://tolweb.org/> ; última consulta: 18. XII. 2013

Laurence, S., W. D. Coltman, C. J. Gorrell, I. A. Schulte-Hostedde .2011. Genetic structure of Muskrat (*Ondatra zibethicus*) and its concordance with taxonomy in North America. *Journal of Heredity* 102: 688-696.

Lombard, E. R., D. B. Wake. 1986. Tongue evolution in the lungless salamanders family Plethodontidae IV. Phylogeny of Plethodontid salamanders and the evolution of feeding dynamics. *Systematic Zoology* 35: 532-551.

Maddison, W. P. y D. R. Maddison. 2011. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75.

Marx, H. 1976. Supplementary catalogue of type specimens of reptiles and amphibians in Field Museum of Natural History. *Fieldiana. Zoology* 69: 33-94.

McCormack, J. E., J. Heled, K. S. Delaney, A. T. Peterson y L. L. Knowles. 2011. Calibrating divergence times on species trees versus gene trees: implications for speciation history of *Aphelocoma jays*. *Evolution* 65: 184-202.

Miller, M.A., W. Pfeiffer y T. Schwartz. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees in Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop. (GCE). 14 Nov., New Orleans, L.A.:1-8.

Mueller, L. R., R. J. Macey, M. Jaekel, B. D. Wake, L. J. Boore. 2004. Morphological homoplasy, life history evolution, and historical biogeography of plethodontid salamanders inferred from complete mitochondrial genomes. Proceedings of the National Academy of Sciences 101: 13820-13825.

Nylander, J. A. A. 2004. MrModeltest. Program Distributed by the Author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala. Version 2.3.

Ornelas J.F., V. Sosa, D.E. Soltis, J.M. Daza, C. González, P.S. Soltis, C. Gutiérrez-Rodríguez, A.Espinosa de los Monteros, T. A. Castoe, C. Bell y E. Ruiz-Sanchez. 2013. Comparative phylogeographic analyses illustrate the complex evolutionary history of threatened cloud forest of northern Mesoamerica. Plos One, 8: 1-11

Parra-Olea, G. 2002. Molecular Phylogenetic Relationships of Neotropical Salamanders of the Genus *Pseudoeurycea*. Molecular Phylogenetics and Evolution 22: 234-246.

Parra-Olea, G., M. García-Paris, y B. D. Wake. 2004. Molecular diversification of the genus *Bolitoglossa* and its evolutionary and biogeographic consequences for the invasion of American tropics. Biological Journal of the Linnean Society 81: 325-346.

Parra-Olea, G., M. García-París, T. J. Papenfuss y D. B. Wake. 2005. Systematics of the *Pseudoeurycea bellii* (Caudata : Plethodontidae) species complex. Herpetologica 61: 145-158.

Parra-Olea G., E. Martínez-Meyer, G. Pérez-Ponce de León. 2005a. Forecasting climate change effects on salamander distribution in the highlands of Central Mexico. Biotropica, 37: 202–208.

Parra-Olea, G., S. M. Rovito, L. Marquez-Valdelamar, G. Cruz, R. Murrieta-Galindo y D. B. Wake. 2010. A new species of *Pseudoeurycea* from the cloud forest in Veracruz , México. Zootaxa 68: 57-68.

- Parra-Olea, G., J.C. Windfield, G. Velo-Antón y K.R. Zamudio. 2012. Isolation in habitat refugia promotes rapid diversification in a montane tropical salamander. *Journal of Biogeography*. 39:353-370.
- Pagel, M. y A. Meade. 2004. A phylogenetic mixture model for detecting pattern-heterogeneity in gene sequence or carácter-state data. *Systematic Biology* 53: 571-581.
- Pyron, A. 2011. Divergence Time Estimation Using Fossils as Terminal Taxa and The Origins of Lissamphibia. *Systematic Biology* 60: 466-481.
- Rambaut A. y J. A. Drummond. 2003. Tracer: MCMC trace analysis tool Oxford, UK:University of Oxford. Versión 1.5.
- Rambaut A. 2006. Tree Figure Drawing Tool.Fig. Tree. UK:University of Oxford. Versión 1.4.
- Raffaëlli, J. 2007. Les Urodèles du Monde: Penclen Édition.
- Roelants, K., D. J. Gower, M. Wilkinson, S. P. Loader, S. D. Biju, K. Guillaume, L. Moriau y F. Bossuyt. 2007. Global patterns of diversification in the history of modern amphibias. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 887-892.
- Ronquist, F., J. P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.
- Rovito, S. M. 2010. Lineaje divergence and speciation in the Web-toed Salamanders (Plethodontidae:*Hydromantes*) of the Sierra Nevada, California. *Molecular Ecology* 19: 4554-4571.
- Rovito S.M., D. B. Wake, T. J. Papenfuss, G. Parra-Olea, A. Muñoz-Alonso y C. R. Vásquez-Almazán. 2012. Species formation and geographical range evolution in a genus of Central American cloud forest salamanders (*Dendotriton*). *Journal of Biogeography* 39: 1251-1265.

San Mauro, D., D. J. Gower, O. V. Oommen, M. Wilkinson y R. Zardoya. 2004. Phylogeny of caecilian amphibians (Gymnophiona) based on complete mitochondrial genomes and nuclear RAG1. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33: 413-427.

San Mauro, D., M. Vences, M. Alcobendas, R. Zardoya y A. Meyer. 2005. Notes and Comments. Initial Diversification on Living Amphibians Preceded the Breakup of Pangaea. *The American Naturalist* 165: 590-599.

Sanginés-Franco, C., Isolda Luna-Vega, Othón Alcántara A., Raúl Contreras-Medina. 2011. Distributional Patterns and Biogeographic Analysis of Ferns in the Sierra Madre Oriental, Mexico. *American Fern Journal* 101:81-104.

Smith, H. M. y E. H. Taylor . 1948. An annotated checklist and key to the Amphibia of Mexico. *Bulletin of the United States National Museum* 194: 1-118.

Smith, H. M. y E. H. Taylor . 1950. Type localities of Mexican reptiles and amphibians. *The University of Kansas Science Bulletin* 33: 313-380.

Stephens, M., N. J. Smith, P. Donnelly. 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics* 68: 978-989.

Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei y S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.

Taylor, E. H. 1939 "1938". Concerning Mexican salamanders. *University of Kansas, Science Bulletin* 25:259-314.

Taylor, E. H. 1940. New salamanders from Mexico, with a discussion of certain known forms. *University of Kansas, Science Bulletin* 26: 57-65.

Taylor, E. H. 1944. The genera of Plethodont salamanders in Mexico. Part I. *The University of Kansas, Science Bulletin* 30: 189-232.

Taylor, E. H., y H. M. Smith. 1945. Summary of the collections of amphibians made in México under the Walter Rathbone Bacon traveling scholarship. *Proceedings of the United States National Museum* 95: 521-613.

Taylor, E. H. y H. M. Smith. 1950. Type Localities of Mexican Reptiles and Amphibians. *The University of Kansas, Science Bulletin* 32: 313-380.

Thireau, M. 1986. *Catalogue des Types d'Urodeles du Musée National d'Histoire Naturelle: Revue Critique*, París: Museum National d'Histoire Naturelle.

Uribe-Peña, Z., A. Ramírez-Bautista y G. Casas-Andreu. 1999. Anfibios y reptiles de las serranías del Distrito Federal, México. *Cuadernos del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México* 32:119.

Velo-Antón G., J.L. Parra, G. Parra-Olea y K.R. Zamudio. 2013. Tracking climate change in a dispersal-limited species: reduced spatial and genetic connectivity in a montane salamander. *Molecular Ecology* 22:3261-3278.

Vieites, D. R., M. Min-Sook y D. B. Wake. 2007. Rapid diversification and dispersal during periods of global warming by plethodontid salamanders. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 19903-19907.

Wake, D. B. 2009. What Salamanders Have Taught Us About Evolution. *Annual Review of the Ecology, Evolution, and Systematics* 40: 333-52.

Wake, D. B. 1987. Adaptive radiation of salamanders in Middle American cloud forests. *Annual Missouri Botanical Gardens* 74: 242-264.

Wake, D. B., y J. F. Lynch. 1976. The distribution, ecology and evolutionary history of plethodontid salamanders in tropical America. *Natural History of the Museum Los Angeles Collection Science Bulletin* 25: 1-65.

Wayne, D., A. F. Poon, S. D. W. Frost y S. L. Kosakovsky-Pond. 2010. Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics* 26:2455-7.

Wiens, J. J. 2007. Species Delimitation: New Approaches for Discovering Diversity. *Systematic Biology* 56: 875-878.

Wiens, J. J. y R. M. Servedio. 2000. Species delimitation in systematics: inferring diagnostic differences between species. *Proceedings of the Royal Society* 267: 631-636.

Wiens, J. J., G. Parra-Olea, M. García-París y D. B. Wake. 2007. Phylogenetic history explains elevational biodiversity patterns in tropical salamanders. *Proceedings of the Royal Society of London B* 274: 919-928.

Yang, Z. y B. Rannala. 2012. Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature Reviews Genetics* 13: 303-314.

Zhang, P. y B. D. Wake. 2009. Higher-level salamander relationships and divergence dates inferred from complete mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53: 492-508.

ANEXOS:

TABLAS.

Tabla 1. Localidades de colecta del complejo *P.cephalica*

ESPECIE	N I	LOCALIDAD	LAT.	LONG.	ALT.	ESTADO
<i>Pseudoeurycea sp.</i>	10	Rancho El Cielo, 7.1 km NNW en el centro de Gómez Farías, Reserva de la Biosfera El Cielo.	23.10098	-99.19228	1213	Tamaulipas
<i>Pseudoeurycea sp.</i>	1	0.3 km N de intersección con San Joaquin-Mojonera en el camino a San Juan Enramadas.	20.90838	-99.53593	2364	Querétaro
<i>Pseudoeurycea sp.</i>	1	0.4 km N de intersección con MX120 en camino a estacion Microondas La Pingüica, Reserva de la Biosfera.	21.12267	-99.67469	2649	Querétaro
<i>Pseudoeurycea sp.</i>	1	0.5 km S de la Trinidad en camino a Xilitla.	21.40539	-99.06794	1930	San Luis Potosí
<i>Pseudoeurycea cephalica manni?</i>	2	Zoquizoquipan, Hidalgo	20.65000	-98.71670	SD	Hidalgo
<i>Pseudoeurycea cephalica manni?</i>	2	6 km NE zacualtipan	20.68472	-98.67111	2068	Hidalgo
<i>Pseudoeurycea cephalica manni?</i>	9	14.7 km S Zilacatipan, Veracruz	20.57236	-98.47564	2288	Veracruz
<i>Pseudoeurycea cephalica rubrimembris?</i>	9	1.0 km S (by rd) de La Encarnacion en camino a MX85, Parque Nacional los Marmoles	20.86792	-99.21314	2407	Hidalgo
<i>Pseudoeurycea cafetalera</i>	1	3.5 km SW La Raya, camino a trincheras Ver. Mx.	19.08330	-96.98330	1399	Veracruz
<i>Pseudoeurycea cafetalera</i>	3	Rancho dos Puentes, 6.0km N (by rd) de entrada a Huatusco	19.18621	-96.96204	1307	Veracruz
<i>Pseudoeurycea cafetalera</i>	2	Bosque cerca de La Joya Chica, 2.9km S de La Joya	19.58578	-97.02895	2259	Veracruz
<i>Pseudoeurycea cafetalera</i>	2	17 km S Huayacocotla (19km N Agua Blanca), Ver. Mx	20.55000	-98.48330	2400	Veracruz
<i>Pseudoeurycea cephalica</i>	5	4.1km S de Mineral del Chico en camino a Pachuca, Parque Nacional El Chico	20.19801	-98.72749	2768	Hidalgo
<i>Pseudoeurycea cephalica</i>	2	Rancheria de Tlaltizapan, Edo Mex. Carr Cuernavaca-Ocuplan (chalma)	18.96694	-99.35028	2445	Edo. de México
<i>Pseudoeurycea cephalica</i>	3	2 km W Tejocotal, hotel campestre la Cabaña, Hgo. Mx.	20.14056	-98.12722	2000	Hidalgo
<i>Pseudoeurycea cephalica</i>	5	UNAM circuito.	19.33330	-99.20000	SD	D.F.
<i>Pseudoeurycea cephalica</i>	6	Desierto de Los Leones, Los Ocotales, DF	19.25333	-99.33083	SD	D.F.
<i>Pseudoeurycea cephalica</i>	2	Lagunas de Zempoala	19.05361	-99.31500	SD	Morelos
<i>Pseudoeurycea cephalica</i>	1	2 km N El Mirador (Teziutlan), Pue. Mx.	19.81670	-97.35000	1850	Puebla

<i>Pseudoeurycea quetzalanensis</i>	1	Hueyapan, Puebla.	19.87920	-97.45000	SD	Puebla
<i>Pseudoeurycea quetzalanensis</i>	1	Xocoyolo, Pue. Mx.	20.00000	-97.53330	1130	Puebla
<i>Pseudoeurycea cephalica</i>	2	RMO DONI, 20 km S Chignahuapan, Pue. Mx.	19.83330	-98.03330	3050	Puebla
<i>Pseudoeurycea cephalica</i>	3	2 km S Ahuazotepec, (cerca de zacatlan), Pue. Mx.	20.05000	-98.15000	2100	Puebla
<i>Pseudoeurycea cephalica</i>	2	km 35 carr Apizaco-Chignahuapan, Puebla.	19.69411	-98.08328	2880	Puebla
<i>Pseudoeurycea cephalica</i>	1	Aguazuelas, carr a Acocota, 4 km del cruce con Hwy, saliendo de Toxtlacuaya	19.59578	-97.07028	2600	Veracruz
<i>Pseudoeurycea cephalica</i>	1	2.9 km E (by rd) of Cruz Blanca on MX140	19.64208	-97.14334	2513	Veracruz
TOTAL	78					
GRUPO EXTERNO	NI					
<i>Pseudoeurycea galeanae</i>	2					
<i>Pseudoeurycea gigantea</i>	1					
<i>Pseudoeurycea boneti</i>	1					
<i>Pseudoeurycea scandens</i>	1					
<i>Pseudoeurycea sierraoccidentalis</i>	2					
<i>Pseudoeurycea rex</i>	1					
TOTAL	8					
NI Numero de individuos						

Tabla 2. Reactivos y volúmenes usados en la reacción de PCR.

MEZCLA PCR DNAm	μl
H ₂ O	16.3
Buffer 10X	5
MgCl ₂ 25mM	1.5
dNTPs 10mM	0.5
DMSO 5%	0.15
Primer FW 10pM	0.3
Primer RV 10pM	0.3
Taq 5U/μl	0.125
Extracción DNA	1
TOTAL	25
MEZCLA PCR DNAnu; RAG1 y BDNF	
H ₂ O	17.8
Buffer 10X	4
MgCl ₂ 25mM	0.7
dNTPs 10mM	0.3
DMSO 5%	0.3
Primer FW 10pM	0.3
Primer RV 10pM	0.3
Taq 5U/μl	0.3
Extracción DNA	1
TOTAL	25
MEZCLA PCR DNAnu; POMC	
H ₂ O	7.35
Buffer 10X	1
MgCl ₂ 25mM	0.35
dNTPs 10mM	0.15
DMSO 5%	0.15
Primer FW 10pM	0.15
Primer RV 10pM	0.15
Taq 5U/μl	0.2
Extracción DNA	0.5
TOTAL	10

Tabla 3.- Programas utilizados para la amplificación.

Programa DNAm	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	96°	02:00	
Desnaturalización	95°	00:30	35
Alineación	55°	01:00	35
Elongación	72°	05:00	35
Elongación Final	72°	10:00	
Temperaturas DNAnu RAG1			
Desnaturalización Inicial	96°	01:00	
Desnaturalización	95°	00:30	35
Alineación	61°	01:00	35
Elongación	72°	01:00	35
Elongación Final	72°	07:00	
Temperaturas DNAnu POMC			
Desnaturalización Inicial	96°	01:00	
Desnaturalización	95°	00:30	35
Alineación	60°	01:00	35
Elongación	72°	01:00	35
Elongación Final	72°	07:00	
Temperaturas DNAnu BDNF			
Desnaturalización Inicial	96°	01:00	
Desnaturalización	95°	00:30	35
Alineación	55°	01:00	35
Elongación	72°	01:00	35
Elongación Final	72°	07:00	

Tabla 4.- Modelos y resultados del factor Bayes para las estrategias de partición.

	Concatenados mitocondriales		Factor Bayes	
	Genes	Modelos	LnP	D.S.
Sin particion	(12S,16S,RNAt,ND1)	GTR+I+G.	-14825.717	0.382
4 particiones	12S, 16S ,RNAt, ND1	GTR+G, GTR+I+G, GTR+G, HKY+I+G	-14759.474	0.355
6 particiones	12S, 16S, RNAt, ND1_1, ND1_2, ND1_3	GTR+G, GTR+I+G, GTR+G, SYM+G, HKY+I, GTR+I+G	-14472.766	0.395
	Concatenados 12S,16S y RNAt		Factor Bayes	
	Genes	Modelos	LnP	D.S.
Sin particion	(12S,16S y RNAt)	GTR+I+G	-9167.415	0.368
3 particiones	12S, 16S y RNAt	GTR+G, GTR+G, GTR+I+G	-9148.269	0.33
	Concatenados ND1		Factor Bayes	
	Genes	Modelos	LnP	D.S.
Sin particion	ND1	HKY+I+G	-5373.48	0.516
3 particiones	ND1_1, ND1_2, ND1_3	SYM+G, HKY+I, GTR+I+G	-5093.506	0.399
	Concatenados RAG-1		Factor Bayes	
	Genes	Modelos	LnP	D.S.
Sin particion	RAG-1	HKY+I+G	-1747.398	0.302
3 particiones	RAG-1_1, RAG-1_2, RAG-1_3	F81, F81+I, HKY+I+G	-1637.174	0.33
	Concatenados POMC		Factor Bayes	
	Genes	Modelos	LnP	D.S.
Sin particion	POMC	GTR+I+G	-1722.548	0.264
3 particiones	POMC_1, POMC_2, POMC_3	GTR+G, GTR+I, HKY+I	-1602.411	0.242
	Concatenados BDNF		Factor Bayes	
	Genes	Modelos	LnP	D.S.
Sin particion	BDNF	HKY+I+G	-1794.936	0.464
3 particiones	BDNF_1, BDNF_2, BDNF_3	GTR+I, GTR, HKY+G	-1701.642	0.219
	Concatenados nucleares		Factor Bayes	
	Genes	Modelos	LnP	D.S.
Sin particion	(RAG-1,POMC,BDNF)	GTR+I+G	-5297.878	0.338
3 particiones	RAG-1, POMC, BDNF	HKY+I+G, GTR+I+G, HKY+I+G	-5062.343	0.323
9 particiones	RAG-1_1, RAG-1_2, RAG-1_3, POMC_1, POMC_2, POMC_3, BDNF_1, BDNF_2, BDNF_3	F81, F81+I, HKY+I+G, GTR+G, GTR+I, HKY+I, GTR+I, GTR, HKY+G	-4963.503	0.414
	Evidencia Total		Factor Bayes	
	Genes	Modelos	LnP	D.S.
Sin particion	(12S,16S,RNAt,ND1,RAG-1,POMC,BDNF)	GTR+I+G	-20908.375	0.432

7 particiones	12S, 16S ,RNA _t , ND1, RAG-1, POMC, BDNF	GTR+G, GTR+I+G, GTR+G, HKY+I+G, HKY+I+G, GTR+I+G, HKY+I+G	-20642.292	0.416
15 particiones	12S, 16S, RNA _t , ND1_1, ND1_2, ND1_3, RAG-1_1, RAG-1_2, RAG-1_3, POMC_1, POMC_2, POMC_3, BDNF_1, BDNF_2, BDNF_3	GTR+G, GTR+I+G , GTR+G, SYM+G, HKY+I, GTR+I+G, F81, F81+I, HKY+I+G ,GTR+G, GTR+I, HKY+I, GTR+I, GTR, HKY+G	-20220.214	0.473

Tabla 5. Sustitución y porcentaje de nucleótidos para los genes 12S y RNA_t.

	A	T/U	C	G		%
A	0	5.4	1.25	10.63	A	34.57
T/U	7.57	0	21.36	1.8	T/U	24.69
C	1.95	23.86	0	1.8	C	22.11
G	19.82	2.38	2.14	0	G	18.62

Tabla 6. Sustitución y porcentaje de nucleótidos para el gen 16S.

	A	T/U	C	G		%
A	0	4.51	3.45	1.62	A	39.14
T/U	6.93	0	25.58	2.81	T/U	25.49
C	6.93	33.42	0	2.81	C	15.85
G	3.99	4.51	3.45	0	G	19.51

Tabla 7. Sustitución y porcentaje de nucleótidos para el gen ND1.

	A	T/U	C	G		%
A	0	3.02	2.27	7.09	A	34.76
T/U	3.43	0	22.31	1.15	T/U	30.59
C	3.43	26.62	0	1.15	C	11.61
G	21.22	3.02	2.27	0	G	23.04

Tabla 8. Sustitución y porcentaje de nucleótidos para el gen RAG-1.

	A	T/U	C	G		%
A	0	4.24	3.78	11.58	A	26.95
T/U	4.35	0	20.15	3.77	T/U	26.28
C	4.35	22.61	0	3.77	C	23.34
G	13.37	4.24	3.78	0	G	23.42

Tabla 9. Sustitución y porcentaje de nucleótidos para el gen POMC.

	A	T/U	C	G		%
A	0	3.28	5.79	7.09	A	32.01
T/U	7.18	0	25.41	6.17	T/U	14.65
C	7.18	14.42	0	6.17	C	27.51
G	8.25	3.28	5.79	0	G	25.82

Tabla 10. Sustitución y porcentaje de nucleótidos para el gen BDNF.

	A	T/U	C	G		%
A	0	3.91	4.72	16.04	A	27.12
T/U	5.24	0	16.34	5.45	T/U	20.25
C	5.24	13.54	0	5.45	C	28.2
G	15.43	3.91	4.72	0	G	24.43

Tabla 11. Distancias genéticas corregidas del gen mitocondrial ND1.

	Clado_I	Clado_II	Clado_III	Clado_IV	Clado V	<i>P.quetzalanensis</i>
Clado_I						
Clado_II	9.6					
Clado_III	17.8	17.7				
Clado_IV	18	17.8	2.2			
Clado V	17.2	17.9	10.4	10.6		
<i>P.quetzalanensis</i>	16.8	17	11.8	12.4	11	
Clado_VII	16.4	16.3	11.3	12.2	10.2	3.6

Tabla 12. Lista de Sinonimias para las especies del complejo *P.cephalica*

Pseudoeurycea cephalica (Cope, 1865)

Spelerpes cephalicus Cope, 1865. Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia, 17:196. Por un error tipográfico se describió bajo el nombre de *Spelerpes lineolus*. Tipo: perdido *fide* Dunn (de acuerdo con Taylor, 1939 "1938", Univ. Kansas Sci. Bull., 25: 284; Smith y Taylor, 1948. Bull. U. S. Natl. Mus. 194: 30). Neotipo: EHT-HMS 4372 (ahora FMNH, 100,018; Marx, 1976. Field. Zool. 69: 41). Localidad tipo: "Mexican Table Land. Collector: " Meseta Central de México, Dr. C. Sartorius. Smith y Taylor, 1950, Univ. Kansas Sci. Bull., 33: 341 restringieron la localidad tipo a "Mexico; Puebla; 2 miles east of Río Frío" 2 millas al este de Río Frío, Puebla, México; NOTA: aunque en el trabajo de 1948 reconocen que el neotipo proviene de "Cruz Blanca, Veracruz".

Spelerpes sulcatum Brocchi, 1883. Miss. Scient. Mex. Amer. Centr., Rech. Zool., 3(2, livr. 3): 110. Holotipo: MNHNP 6396, de acuerdo con Guibé, 1950 "1948", Cat. Types Amph. Mus. Natl. Hist. Nat.: 10, y Thireau, 1986, Cat. Types Urodeles Mus. Natl. Hist. Nat., Rev. Crit.: 73 (Frost, 2013). Localidad Tipo: "Mexico".

Spelerpes sulcatus Boulenger, 1884, Zool. Rec., 20: 22 redescubrió a partir de Cope, 1865 (Taylor, 1939 "1938"; Frost, 2013).

Geotriton cephalicus Garman, 1884, Bull. Essex Inst., 16: 39 lo colocó en el género *Geotriton*.

Oedipus cephalicus (en parte) Dunn, 1924, Field Mus. Nat. Hist. Publ., Zool. Ser., 12: 99.(auct. *leprosus*). Taylor, 1939 "1938", Univ. Kansas Sci. Bull., 25: 284.

Oedipus sulcatus Dunn, 1924, Field Mus. Nat. Hist. Publ., Zool. Ser., 12: 99. Taylor, 1939 "1938", Univ. Kansas Sci. Bull., 25: 272,

Pseudoeurycea cephalica Taylor, 1944. Univ. Kansas Sci. Bull. 30: 198.

Pseudoeurycea cephalica cephalica Taylor, 1944, Univ. Kansas Sci. Bull., 30: 209.

Bolitoglossa cephalica cephalica Taylor and Smith, 1945, Proc. U.S. Natl. Mus., 95: 538.

Magnadigita sulcata Smith and Taylor, 1948, Bull. U.S. Natl. Mus., 194: 22.

Pseudoeurycea cephalica cephalica Smith and Taylor, 1948, Bull. U.S. Natl. Mus., 194: 29-30.

Pseudoeurycea sulcata Brame, 1963 "1962", Herpetologica, 18: 243.

Pseudoeurycea cocranae Brame, 1963 "1962", Herpetologica, 18: 243.

Pseudoeurycea manni (Taylor, 1939 "1938")

Oedipus leprosus (en parte) Dunn, 1918, Bull. Mus. Comp. Zool., 62: 470. Muestras de "Mexico:Hidalgo, Guerrero" (especimens MCZ 3912-3930).

Oedipus cephalicus (en parte) Dunn, 1924, Field Mus. Nat. Hist. Publ., Zool. Ser., 12: 99.(auct. *leprosus*). Dunn, 1926 Smith College Fiftieth Ann. Publ., 381-384 (MCZ 3912-3929).

Oedipus manni Taylor, 1939 "1938", Univ. Kansas Sci. Bull., 25: 277. Tipo: MCZ 3915. de "Guerrero, Hidalgo, Mexico" México. La localidad tipo la toma de , W.M.Mann, como colector; EHT-HMS 15656-15657, "near Zacualtipan, Hidalgo" cerca de Zacualtipan, Hidalgo, México.

Pseudoeurycea cephalica manni Taylor, 1944, Univ. Kansas Sci. Bull., 30: 209.

Pseudoeurycea cephalica manni Smith and Taylor, 1948, Bull. U.S. Natl. Mus., 194: 30.

Pseudoeurycea rubrimembris (Smith y Taylor, 1945)

Bolitoglossa cephalica rubrimembris Taylor and Smith, 1945, Proc. U.S. Natl. Mus., 95: 539. Holotipo: USNM 110661, por designación original. Localidad tipo: "Mexico; Hidalgo; 6 kilometers south of Santa Anita" seis kilómetros al sur de Santa Anita, Hidalgo, México.

Pseudoeurycea cephalica rubrimembris Smith and Taylor, 1948, Bull. U.S. Natl. Mus., 194: 30.

FIGURAS.

Distribución y puntos de colecta del complejo *Pseudoeurycea cephalica*.

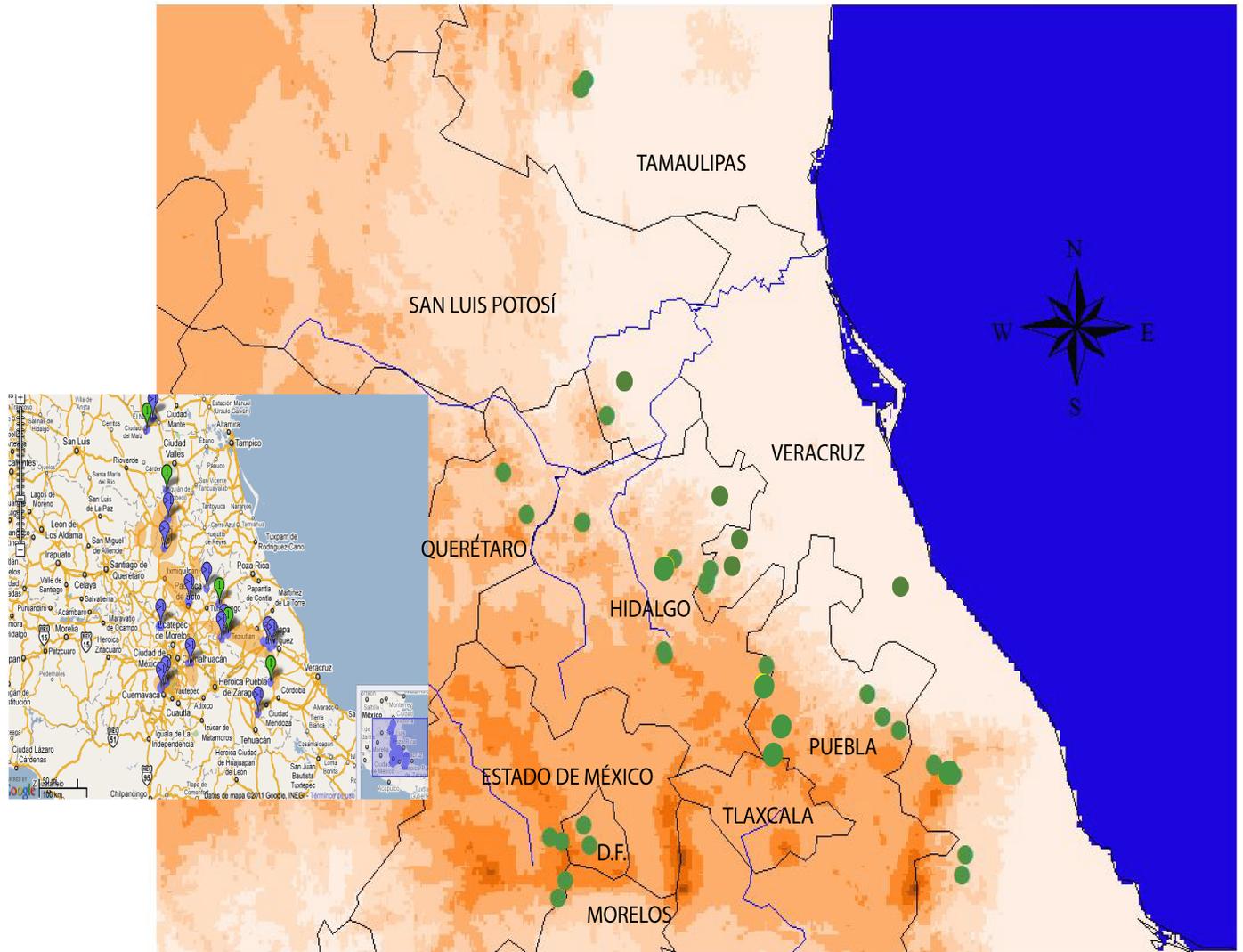


Fig. 1. Distribución y sitios de colecta del complejo *P. cephalica*.

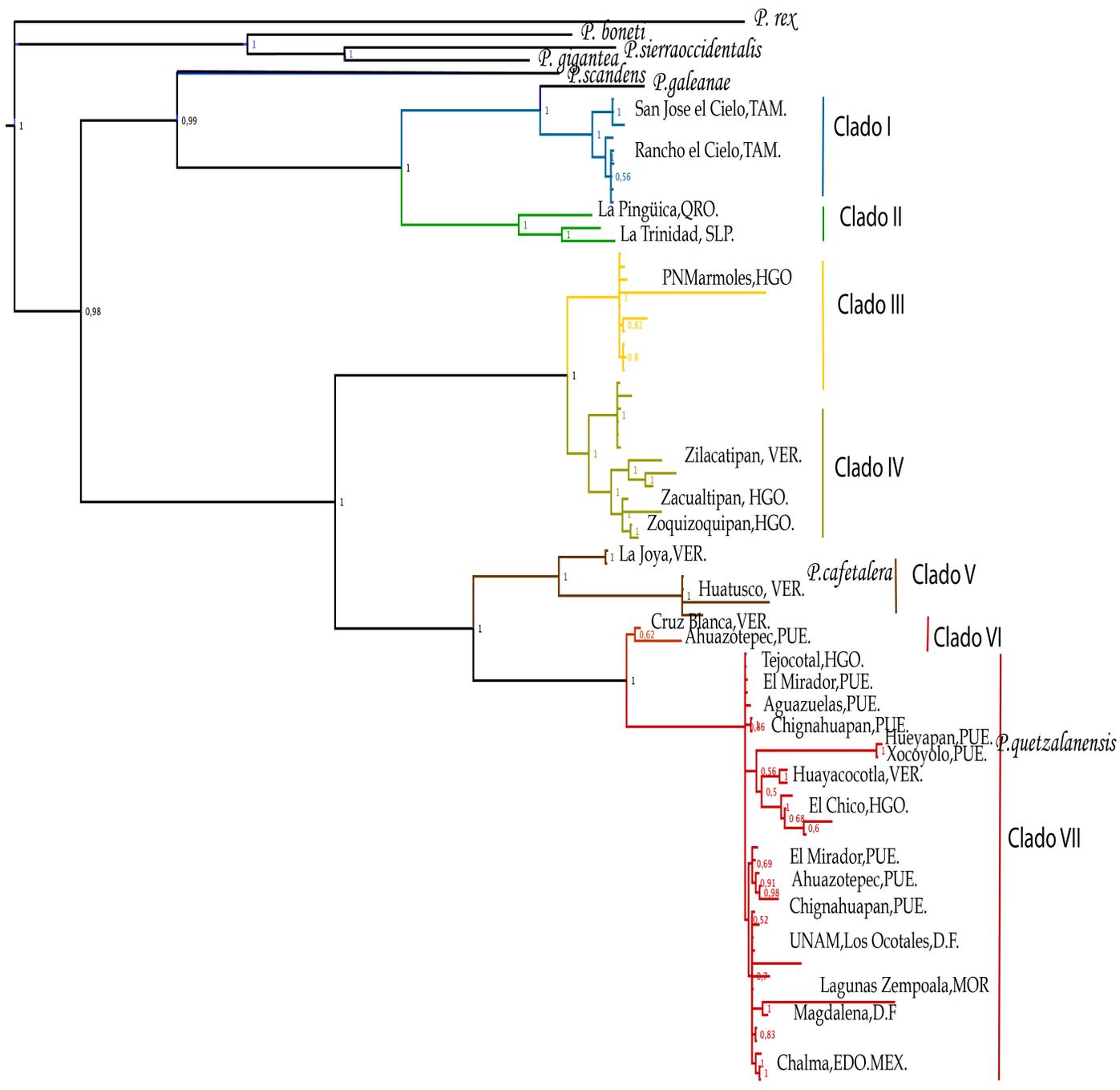


Fig. 2. Árbol resultado del análisis Bayesiano para los genes mitocondriales concatenados con 6 particiones (LnP= -14472.766 +/- D.S.=0.395). Se indican los valores de probabilidad posterior para el apoyo de las ramas en los internodos.

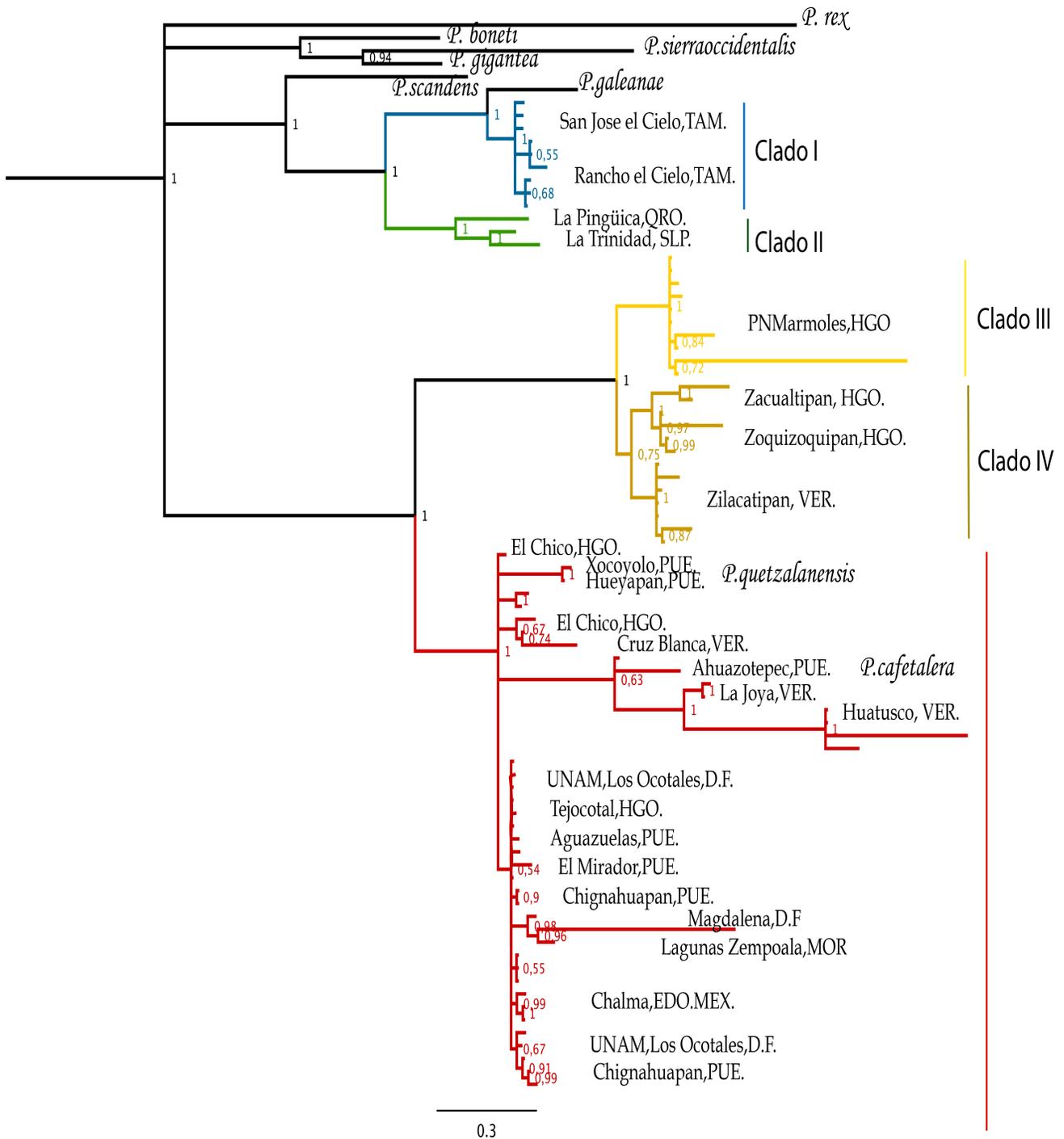


Fig. 3. Árbol del análisis Bayesiano para los genes mitocondriales 12S, 16S y RNAt con 3 particiones (LnP = -9148.269 +/- D.S. = 0.333). Se indican los valores de probabilidad posterior para el apoyo de las ramas en los internodos.

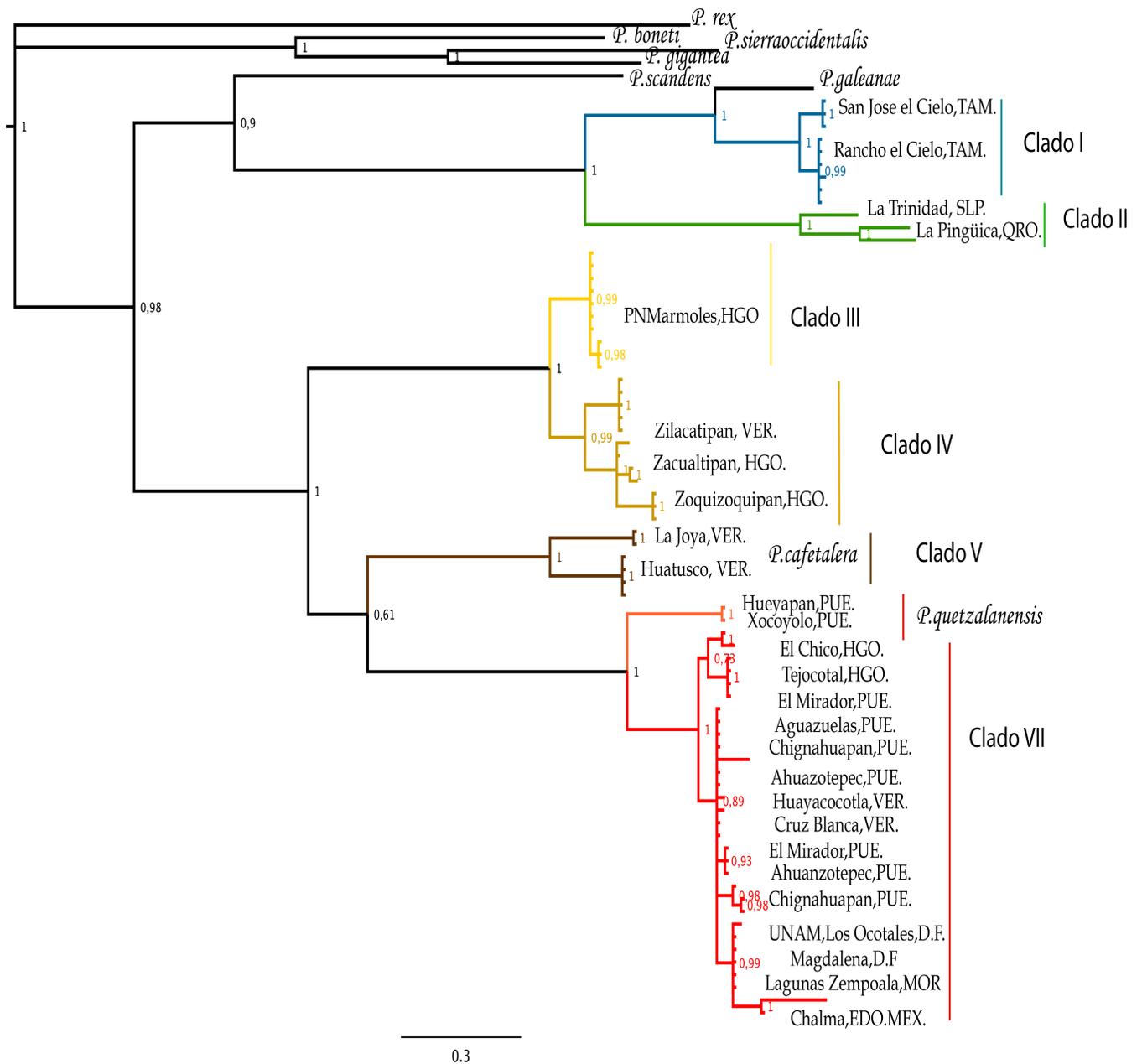


Fig. 4. Árbol del análisis Bayesiano para los genes mitocondriales ND1 con 3 particiones (LnP= -5093.506 +/- D.S.=0.399). Se indican los valores de probabilidad posterior para el apoyo de las ramas en los internodos.

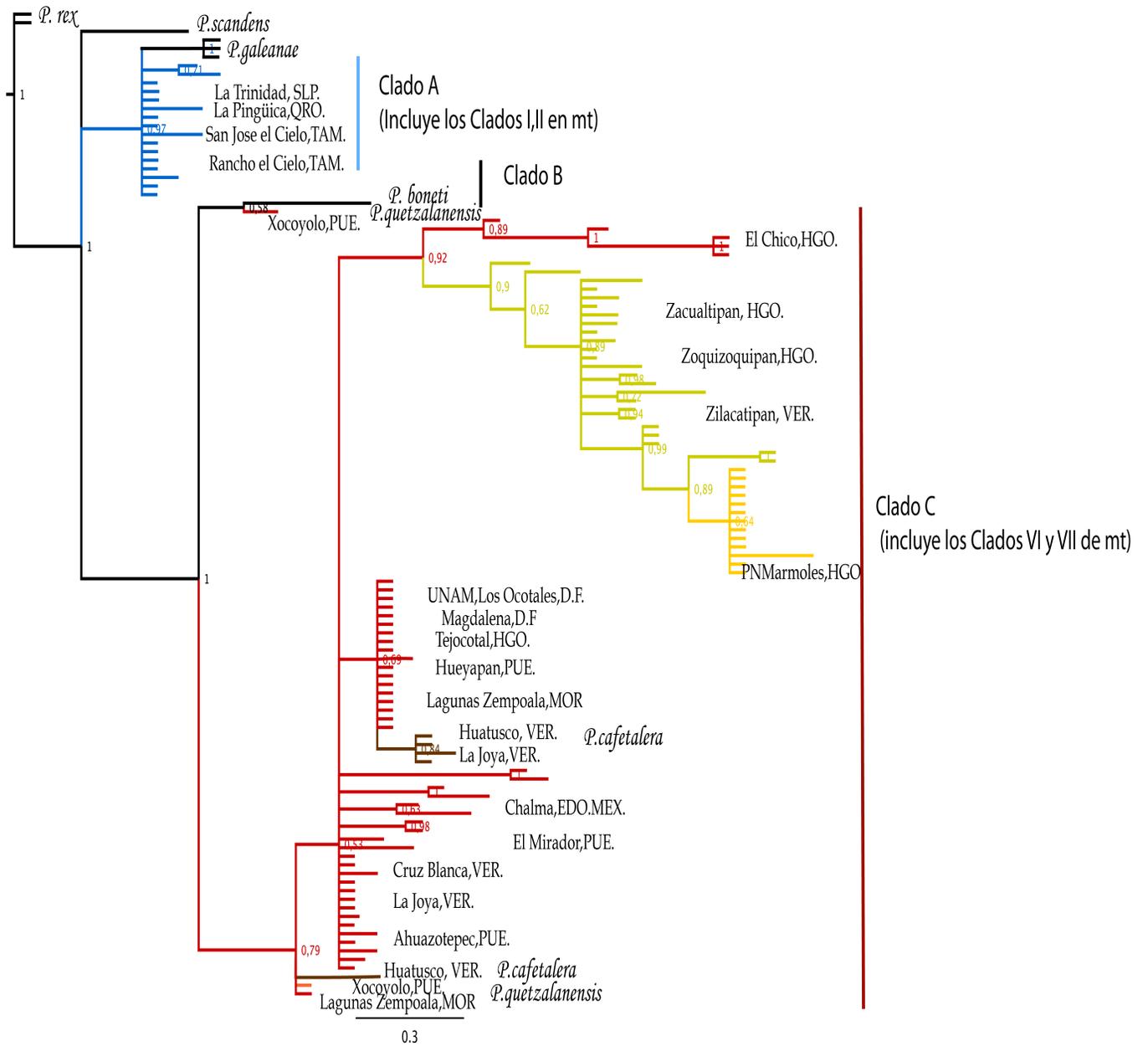


Fig. 5. Árbol del análisis Bayesiano para los gen nuclear RAG-1 con 3 particiones (LnP= -1637.174 +/- D.S.=0.333). Se indican los valores de probabilidad posterior para el apoyo de las ramas en los internodos.

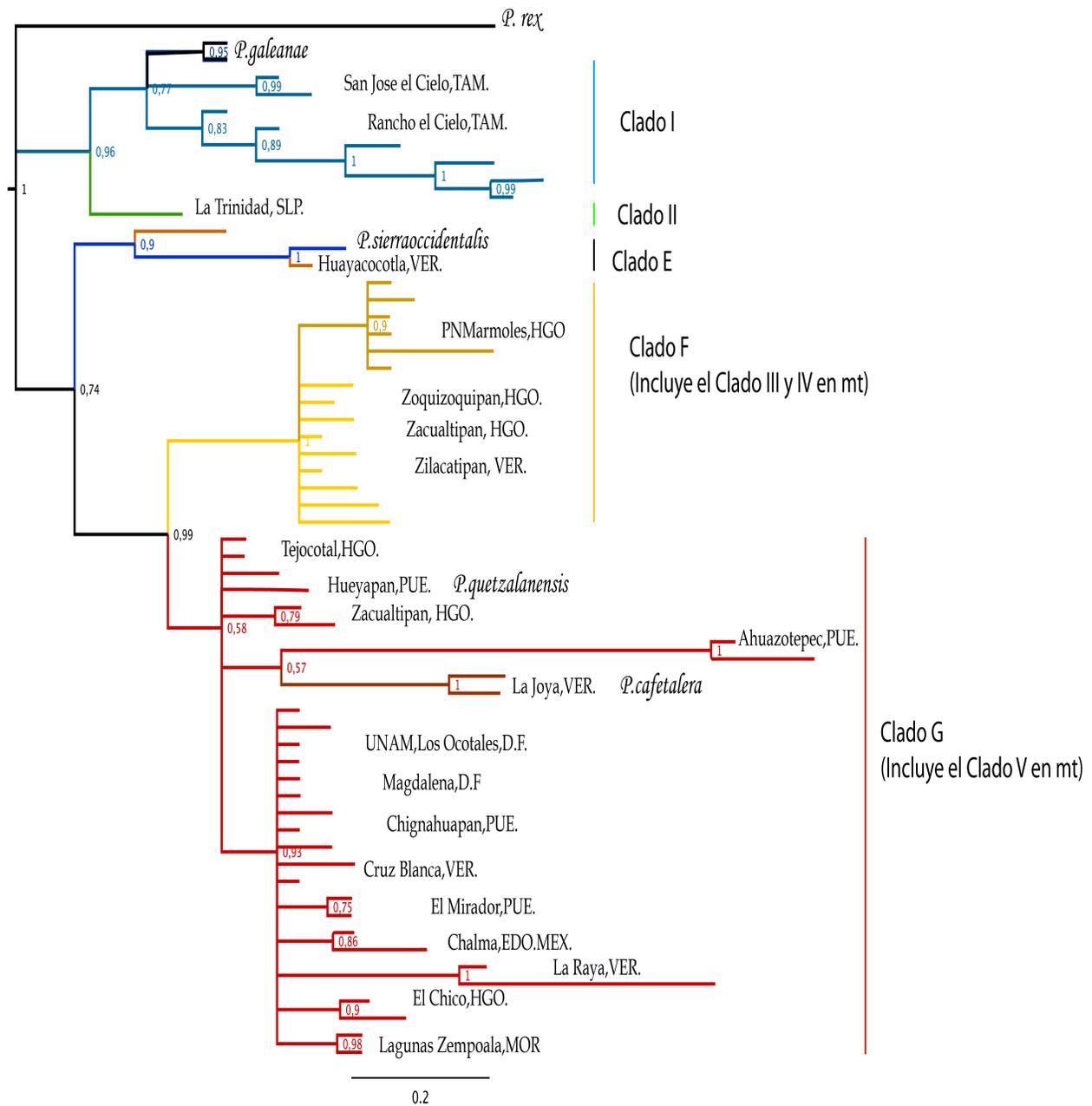


Fig. 6. Árbol del análisis Bayesiano para los gen nuclear POMC con 3 particiones (LnP= -1602.411 +/- D.S.=0.242). Se indican los valores de probabilidad posterior para el apoyo de las ramas en los internodos.

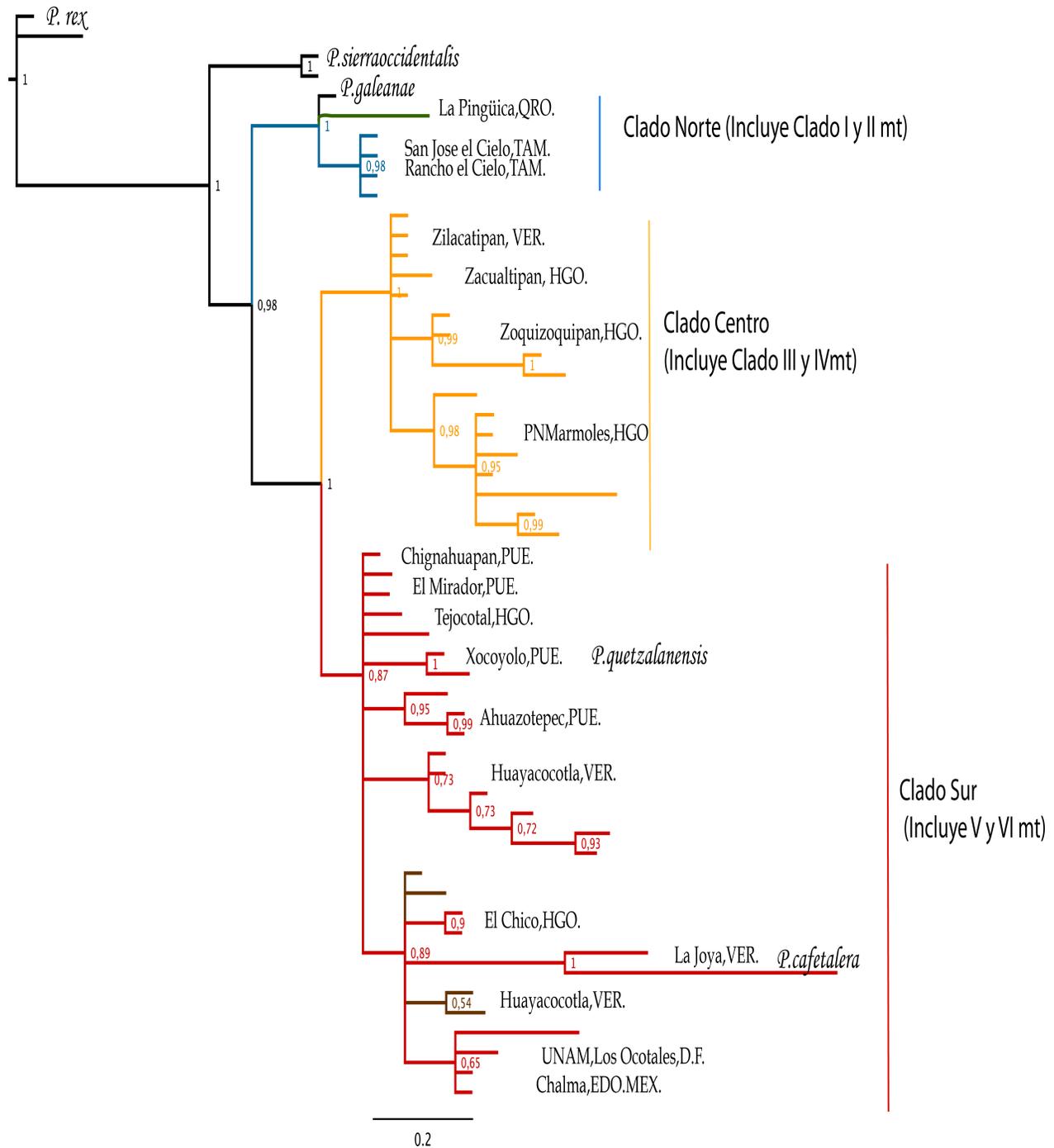


Fig 7. Árbol del análisis Bayesiano para los gen nuclear BDNF con 3 particiones (LnP= -1701.642+/- D.S.=0.219). Se indican los valores de probabilidad posterior para el apoyo de las ramas en los internodos.

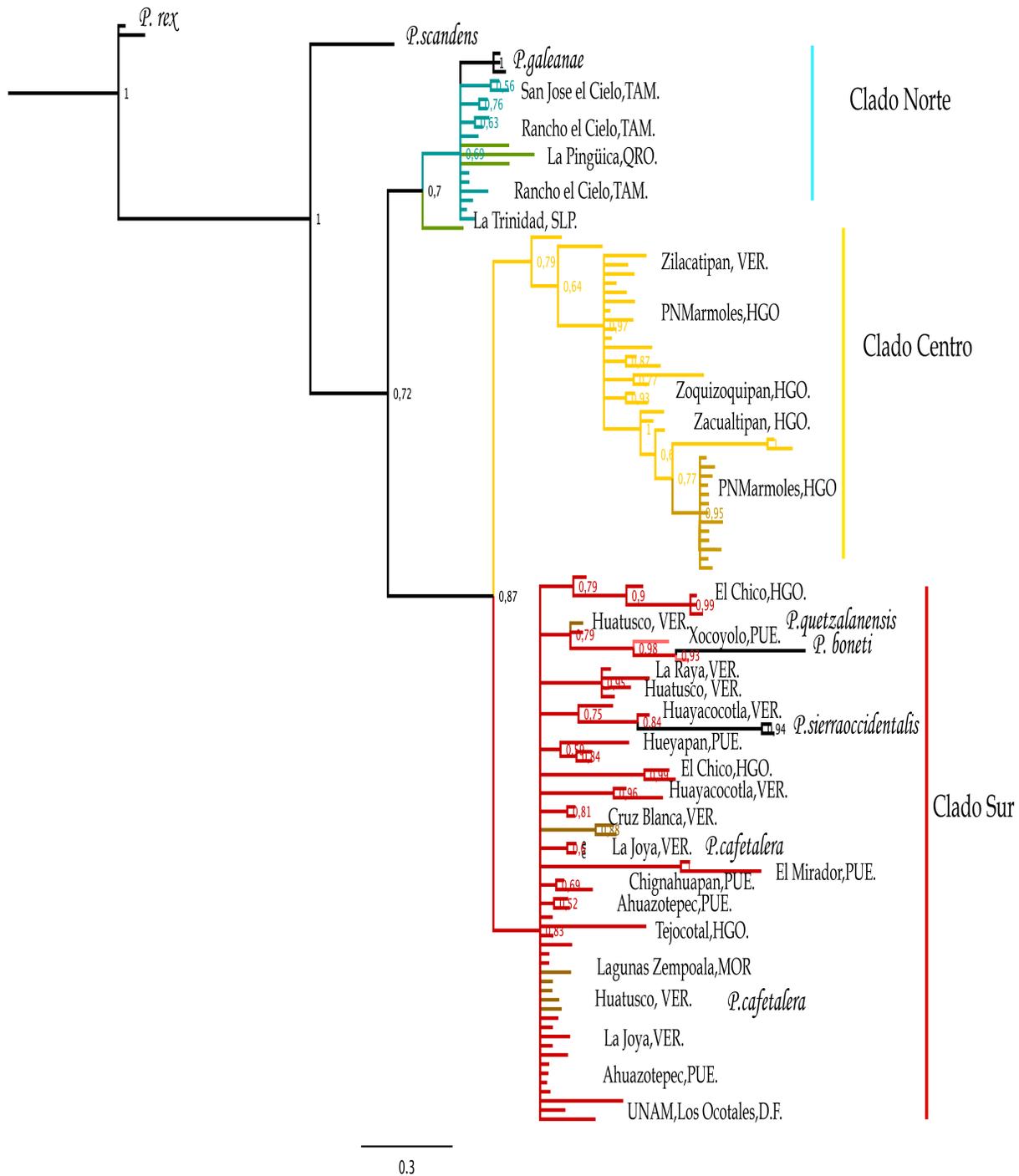


Fig. 8. Árbol del análisis Bayesiano para los genes nucleares concatenados con 9 particiones (LnP= -4963.503+/- D.S.=0.414). Se indican los valores de probabilidad posterior para el apoyo de las ramas en los internodos.

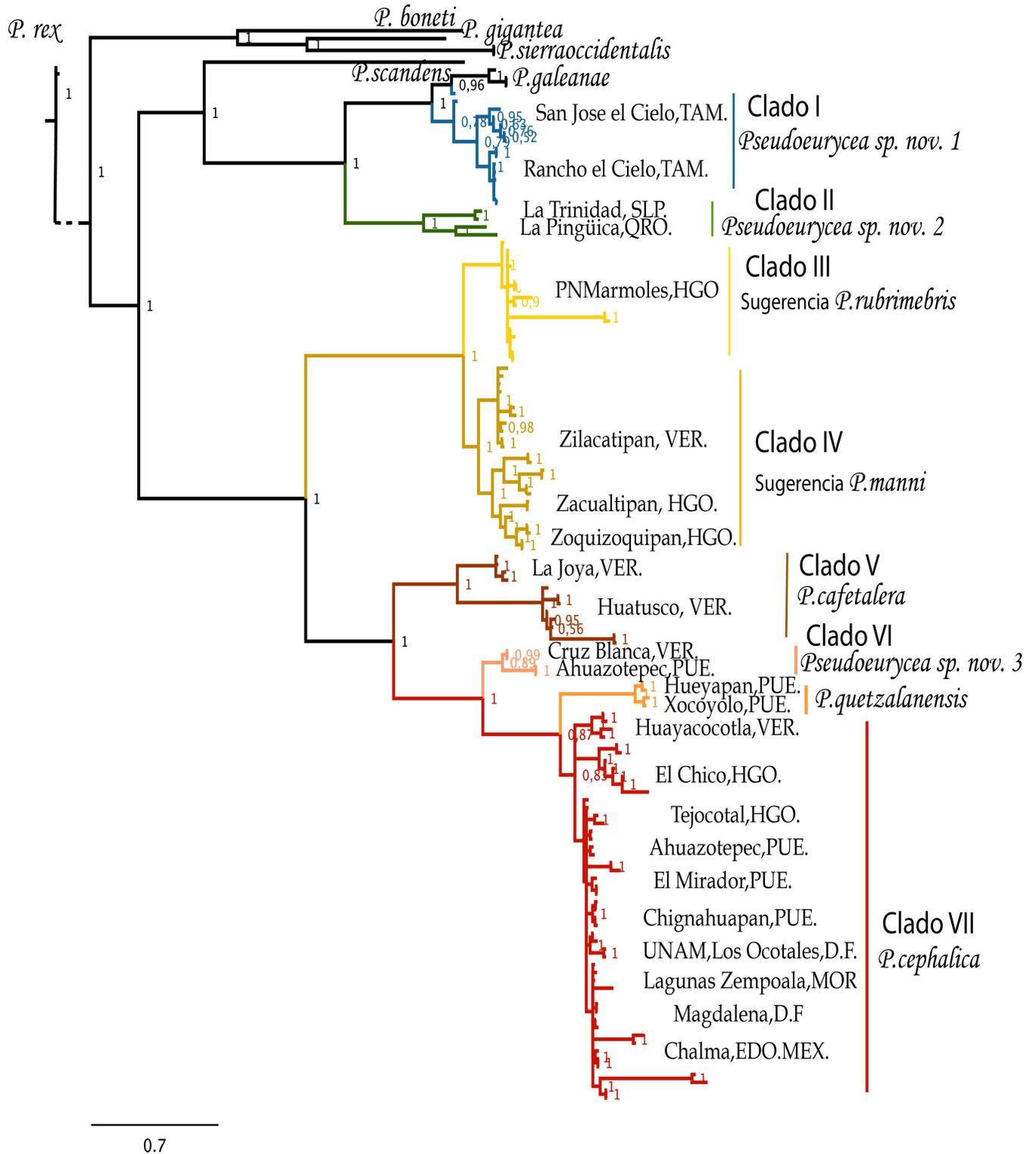


Fig. 9. Árbol del análisis Bayesiano de la evidencia total con 15 particiones (LnP= - 20220.214+/- D.S.=0.473). Se indican los valores de probabilidad posterior para el apoyo de las ramas en los internodos y los nombres con los taxones encontrados y las sugerencias.

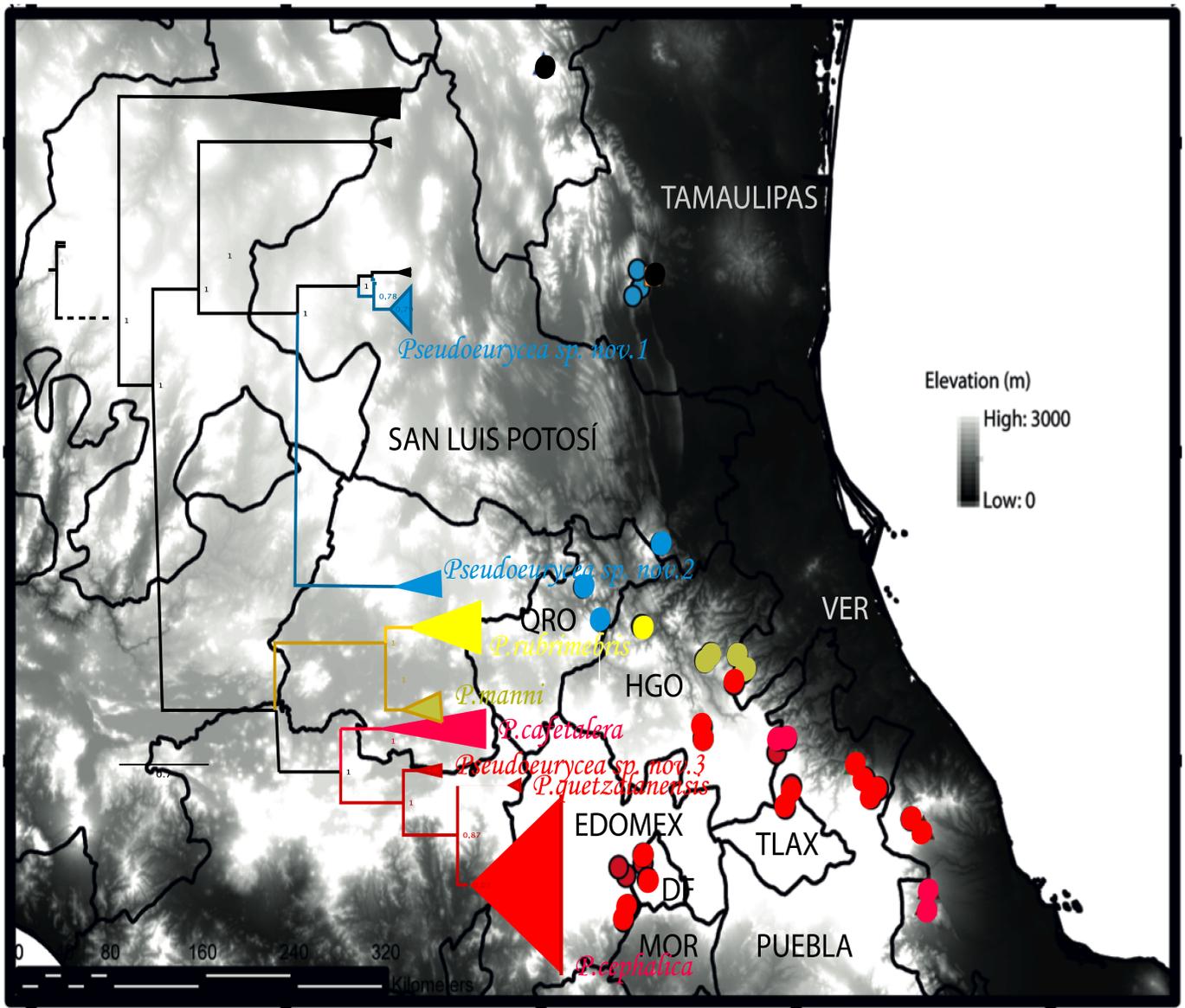


Fig. 10. Mapa de los patrones de distribución de acuerdo al Árbol bayesiano de la evidencia total denotando tres Clados; Norte (Azul), Centro (Amarillo) y Sur (Rojo).