



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA
SISTEMÁTICA

FILOGENIA MOLECULAR DEL GÉNERO *Chiropterotriton*
(PLETHODONTIDAE: CAUDATA)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(SISTEMÁTICA)

PRESENTA:

Biol. Mirna Grisel García Castillo

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: **Dra. Gabriela Parra Olea**
Instituto de Biología

COMITÉ TUTOR: **Dr. Oscar Flores Villela**
Facultad de Ciencias
Dr. Alejandro Zaldívar Riberón
Instituto de Biología

MÉXICO, D.F.

ABRIL 2014



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 Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 3 de junio de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **GARCÍA CASTILLO MIRNA GRISEL** con número de cuenta 300173675 con la tesis titulada "Filogenia molecular del género *Chiropterotriton* (Caudata: Plethodontidae)", realizada bajo la dirección de la **DRA. GABRIELA PARRA OLEA**:

Presidente: DRA. ELLA GLORIA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ
Vocal: DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU
Secretario: DR. ALEJANDRO ZALDÍVAR RIVERÓN
Suplente: DR. ADRIAN NIETO MONTES DE OCA
Suplente: M. EN C. LAURA MARGARITA MÁRQUEZ VALDELAMAR

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 13 de enero de 2014.

M 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, por la oportunidad de pertenecer a esta institución, el apoyo otorgado para participar en el World Congress of Herpetology y contribuir con mi formación académica.

De la misma manera, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca con el número 262662 brindada durante los dos años correspondientes a los estudios de maestría (2011-2013). También, al apoyo de proyectos de investigación PAPIIT UNAM IN211808 y PAPIIT UNAM IN212111 de la Dra. Gabriela Parra Olea, por el financiamiento del trabajo de laboratorio y campo desarrollado durante mis estudios de maestría.

Al comité Tutorial conformado por:

Dra. Gabriela Parra Olea

Dr. Oscar Flores Villela

Dr. Alejandro Zaldívar Riverón

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi tutora, la Dra. Gabriela Parra Olea por su enseñanza, su ejemplo, por haberme dado este proyecto tan bonito y la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo.

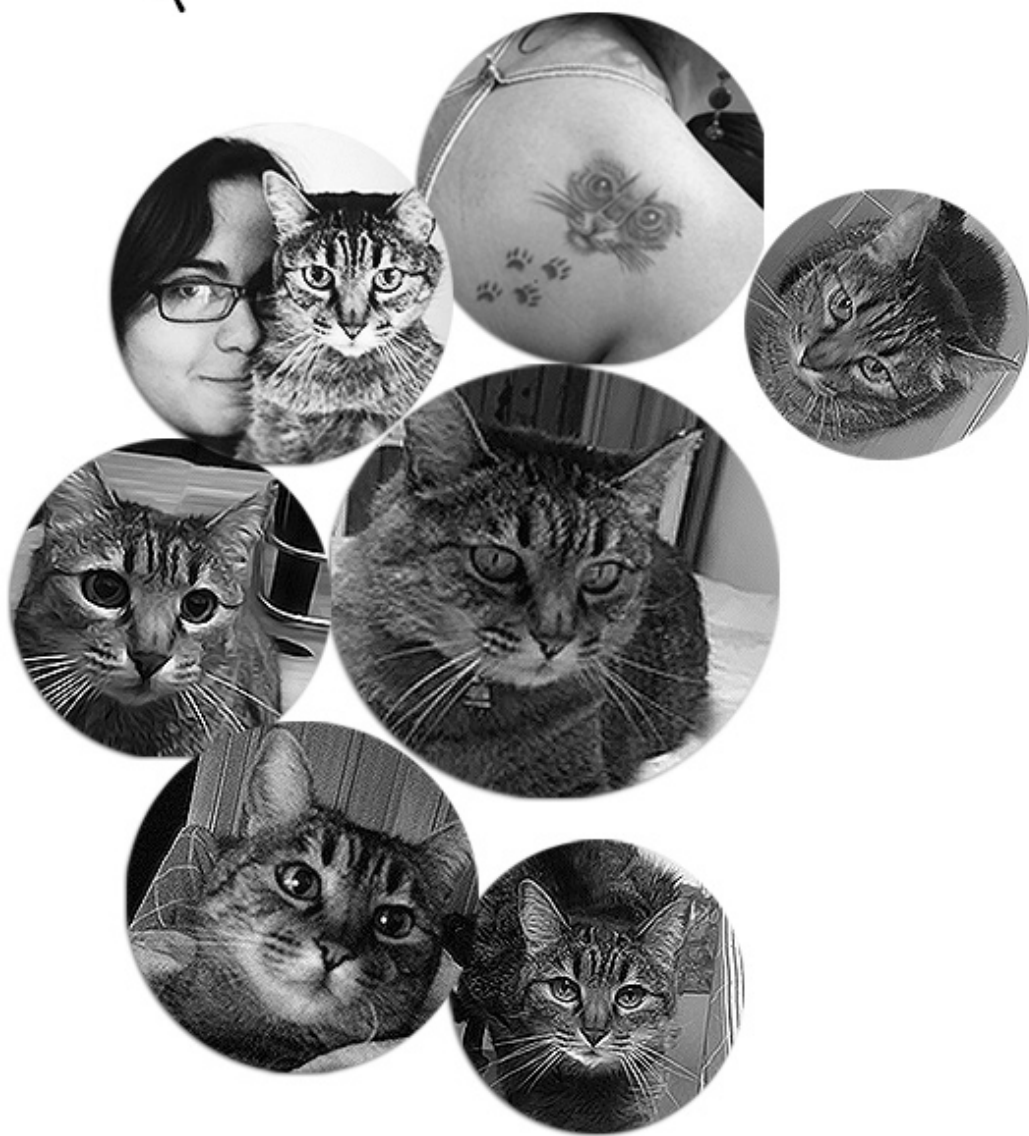
Al Dr. Martín García Varela, por darme el coscorrón necesario en los momentos cruciales, por sus consejos y por motivar mi vida académica.

A mi compañero de laboratorio M. en C. Jorge Sánchez Solís, por ayudarme con mi proyecto desde la parte de laboratorio hasta la parte teórica; muchas gracias por tu disposición para apoyarme, por las risas y por atender siempre a mis dudas. De igual manera, agradezco al M. en C. Daniel Pinacho y Biol. Adriana Cruz por su ayuda y atención.

Al Dr. Sean Rovito por su ayuda y atención de mis dudas, por sus valiosas enseñanzas.

A mi madre María de la Paz Castillo y mi abuela Carmen Varela, por impulsarme y creer en mí, las amo.

Para el ser
que alegró mi vida 12 años...



ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
I. INTRODUCCIÓN	9
1.1 La sistemática molecular en salamandras	10
1.2 Análisis multilocus	11
1.3 Delimitación de especies	13
II. OBJETIVOS	15
III. ANTECEDENTES	15
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	18
4.1 Muestreo taxonómico	18
4.2 Protocolo de laboratorio	21
4.3 Análisis de datos	23
4.4 Delimitación de especies candidato	24
V. RESULTADOS	26
5.1 Marcador mitocondrial	26
5.2 Marcador nuclear	30
5.3 Análisis concatenados	33
5.4 Hipótesis filogenética	36
VI. DISCUSIÓN	44
VII. CONCLUSIONES	50
VIII. CATÁLOGO DE ESPECIES	51
IX. LITERATURA CITADA	64
X. ANEXO	71

Filogenia molecular del género *Chiropterotriton* (Caudata: Plethodontidae)

RESUMEN

El uso de herramientas moleculares en investigaciones recientes ha demostrado que la diversidad de anfibios en México está altamente subestimada, al detectar un gran número de especies crípticas. El género *Chiropterotriton*, es endémico de México con una distribución geográfica a lo largo de la Sierra Madre Oriental, la Faja Volcánica Transmexicana y la Sierra de Juárez. Las especies del género tienen la peculiaridad de poseer una rica diversificación morfológica y ecológica que es atípica en un grupo claramente caracterizado por la estasis morfológica. Cuenta con 12 especies descritas con hábitos y formas terrestres, arborícolas y cavernícolas. Para este trabajo, se recolectaron 117 individuos, se amplificaron dos genes mitocondriales (16S, 12S) y un nuclear (RAG1). Los análisis filogenéticos muestran dos clados principales que corresponden con la distribución geográfica en su región norte y sur. Asimismo, los datos moleculares verifican la identidad de las 12 especies descritas y señala al menos siete linajes como especies candidato confirmadas, sumando un total de 23 especies para este género.

ABSTRACT

The recent use of molecular tools has shown that Mexico's amphibian diversity is highly underestimated, containing a large number of cryptic species. The genus *Chiropterotriton*, is endemic to Mexico with a geographical distribution along the Sierra Madre Oriental, the Mexican Volcanic Belt and Sierra de Juárez. It has the peculiarity of having a rich morphological and ecological diversification than is atypical in a group marked by morphological stasis. *Chiropterotriton* has 12 described species including terrestrial, arboreal and cave dweller species. In this study, 117 individuals were collected, and amplified for mitochondrial (16S, 12S) and nuclear (RAG1) genes. Molecular phylogenies were reconstructed, where two major clades corresponding to geographical distribution in the northern region and southern region were identified. The phylogenetic inferences included 12 described species and five of the previously identified by Darda (1994) and Parra-Olea (2004). This study also suggests that there are at least seven confirmed candidate species, with a total of 23 species in this genus.

I. INTRODUCCIÓN

México es reconocido como uno de los países con mayor biodiversidad del planeta (Flores-Villela y Gerez, 1994; Myers *et al.*, 2000). En términos de herpetofauna, cuenta con 368 especies de anfibios (Amphibiaweb, 2014) y 868 de reptiles (CONABIO, 2009), situándolo entre uno de los cinco países con mayor número de especies de estos grupos en el mundo.

Dentro de los anfibios, el orden Caudata cuenta con 659 especies distribuidas en 10 familias a nivel mundial. Dentro de este orden, la familia Plethodontidae contiene aproximadamente el 66% de todas las especies de salamandras (Wake y Lynch, 1976; Wake, 1987; AmphibiaWeb, 2014). Actualmente, la familia Plethodontidae contiene nueve tribus, dentro de las cuales se encuentra la tribu Bolitoglossini, que incluye 12 géneros y 220 especies de salamandras (Vieites *et al.*, 2011). Los Bolitoglossinos son el clado más diverso de salamandras, resultado de una radiación adaptativa de gran magnitud que ocurrió en Mesoamérica, la cual generó aproximadamente el 40% de la diversidad total de salamandras del mundo (Wake, 1966). A pesar de que las salamandras bolitoglossinas ocurren en casi todos los tipos de bosques, la mayor riqueza se encuentra en altitudes intermedias en los bosques nublados (Wiens *et al.*, 2007). Algunas de las características que les permitieron dicha radiación a estas salamandras es que son completamente terrestres y no requieren pasar una etapa de su vida en un cuerpo acuático. Además, las salamandras bolitoglossinas poseen una amplia variación morfológica asociada a microhábitats específicos (Wake y Lynch, 1976; Wake, 1987). Algunos autores han sugerido que su riqueza se debe en gran medida a su especificidad en la distribución altitudinal y latitudinal que presentan las salamandras de este grupo (Wiens *et al.*, 2007). De esta manera, la comunidad de salamandras presentes en una localidad es altamente endémica, y desde un

punto de vista geográfico más general, la composición de las comunidades es altamente variable de una región a otra (Myers *et al.*, 2000).

I.2 La sistemática molecular en salamandras

El uso de herramientas moleculares en investigaciones recientes ha demostrado que la diversidad de anfibios en México está altamente subestimada, ya que en la última década se ha detectado un gran número de especies (Canseco-Márquez y Parra-Olea, 2003; García-París *et al.*, 2002; Parra-Olea y Wake, 2001; Parra-Olea *et al.*, 2002; Parra-Olea *et al.*, 2004). En un inicio se implementó el uso de aloenzimas, gracias a lo cual se pudo examinar la diversidad de especies, encontrándose subdivisiones en las poblaciones las cuales fueron reconocidas como especies (Highton, 1989; Highton y Peabody, 2000; Weisrock y Larson, 2006). Subsecuentemente, con el uso de secuencias de DNA se pudo detectar un mayor número de especies de pletodontidos (Wake, 2009). El número de especies de salamandras descritas ha cambiado dramáticamente gracias a los descubrimientos recientes, sobre todo en los trópicos del Nuevo Mundo. En México, el incremento de especies descritas ha sido notable desde que las técnicas moleculares fueron implementadas. Al inicio de la década de los 80's el número de especies de salamandras descritas era de 93, en 1995 aumento a 103 y para el 2004 fue de 128, lo que implica que el aumento ha sido de alrededor un 30% considerando el número de especies actual de 134 (Flores-Villela y Canseco-Marquez 2004; AmphibiaWeb, 2014).

La secuenciación y análisis filogenéticos de fragmentos mitocondriales han dado pauta a la propuesta de nuevas especies, incrementando así el número de especies contenida en géneros como son *Batrachoseps* (Jockusch *et al.*, 2001; Jockusch *et al.*, 2012), *Bolitoglossa* (Parra-Olea *et al.*, 2004a), *Desmognathus* (Kozak *et al.*, 2005),

Pseudoeurycea (Parra-Olea *et al.*, 2001; Canseco-Márquez y Parra-Olea, 2003; Parra-Olea *et al.*, 2004) y *Thorius* (Rovito *et al.*, 2013), entre otros. El uso de genes mitocondriales ha sido apoyado dada la alta tasa de evolución que se presenta a nivel de secuencias, no hay recombinación y su herencia materna permite describir una historia matrilineal de eventos mutacionales (Avice, 2008). Por otro lado, el análisis de genes nucleares se ha aplicado en salamandras para tratar de resolver las relaciones filogenéticas, sobre todo por la utilidad que tienen éstos en la resolución de ramas profundas en otros vertebrados (Fisher-Reid y Wiens, 2011). De esta manera, a través genes nucleares se han logrado encontrar patrones de diversificación y dispersión en pleodontidos (Vieites *et al.*, 2007). En otros casos, se han generado filogenias de pleodontidos con genes nucleares que suelen ser discordantes con las filogenias mitocondriales, sin embargo los análisis combinados han apoyado a las hipótesis filogenéticas a nivel de géneros, la existencia de especies candidatas e implicaciones evolutivas de los clados de interés (Chippindale *et al.*, 2004; Fisher-Reid y Wiens, 2011; Vieites *et al.*, 2011; Rovito *et al.*, 2013;).

I.3 Análisis multilocus

El objetivo de la aplicación de los métodos filogenéticos es el de obtener un árbol que pueda explicar las relaciones interespecíficas e intraespecíficas de un grupo de individuos en estudio. En el caso específico de filogenias moleculares, se ha demostrado que la conjunción de datos de diferentes genes mejoran la exactitud de los árboles de especies (Corl y Ellegren, 2013; Maddison y Knowles, 2006). Por ello, una herramienta poderosa para la obtención de hipótesis filogenéticas robustas es el análisis concatenado de secuencias. La concatenación implica combinar datos de diferentes genes o datos de particiones en una sola supermatriz, el análisis de ésta se hace de tal manera que todos los

genes se ajustan a la misma topología. Esta práctica se lleva a cabo con loci de un mismo origen (mitocondria, núcleo o cloroplasto) o combinando todas las fuentes.

Se han debatido las ventajas y desventajas de la utilidad de este método para la inferencia de árboles de especies. Por un lado, están las advertencias de la estimación errónea de un árbol de especies que está basado en múltiples loci, ya que estos poseen distintas tasas de sustitución e implicaciones por la función y herencia de los genes. Hay estudios que demuestran la falta de consistencia de los resultados de concatenación tales como estimaciones filogenéticas estadísticamente inconsistentes conforme se aumenta el número de genes (Kubatko y Degnan, 2007). Por otra parte, la concatenación se ha usado en diferentes estudios presentando múltiples loci con hipótesis filogenéticas que presentan un mejor apoyo de ramas que los obtenidos por separado (Chen y Li, 2001; Rokas *et al.*, 2003). Según el trabajo de Gadagkar *et al.*, 2005, se puede esperar un desempeño de hasta 95% de precisión en datos multilocus con un límite de hasta 10 genes, los sesgos y errores del método están asociados a particiones incorrectas, separación incompleta de linajes y muestreo de un solo individuo por especie (Kubatko y Degnan, 2007), además cuando los árboles de genes son altamente congruentes entre sí el árbol de especies puede ser resuelto con sólo dos o tres loci (Edwards *et al.*, 2007). Asimismo, la aplicación de análisis combinados ayudan a resolver diferentes porciones de la filogenia, ya que el DNA mitocondrial suele tener mayor número de caracteres variables, por lo que ha sido la base principal de las filogenias moleculares, mientras que DNA nuclear ha ayudado a resolver nodos con ramas profundas y límites de especies (Fisher-Reid y Wiens, 2011). La mejora a este método está en aplicar diferentes modelos de sustitución en los diferentes genes o particiones de datos (Edwards, 2009), así como la consideración de los datos por separado antes de concatenar (Fisher-Reid y Wiens, 2011).

1.4 Delimitación de especies con marcadores moleculares

La delimitación de especies ha sido una tarea complicada en distintos grupos biológicos, esto se debe principalmente a los distintos conceptos de especie que existen y donde muchos suelen ser incompatibles. El concepto de especie como una metapoblación que evoluciona en un linaje independiente, es aparentemente la solución ante esta problemática ya que unifica conceptos sin imponer un límite determinado (de Queiroz, 2007). Este concepto ha dado paso a la delimitación de especies en base a filogenias de caracteres moleculares, sin embargo se han propuesto distintos métodos y criterios para los límites entre especies. La mayoría de los estudios realizados con marcadores moleculares suelen incluir más de una evidencia para delimitar especies, sin embargo existen grupos biológicos en los que los límites morfológicos y ecológicos son poco claros, es en estos casos donde las filogenias moleculares representan una evidencia de mayor peso para la toma de decisiones en la taxonomía de estos grupos (Pons *et al.*, 2006).

En el trabajo Wiens y Penkrot (2002) describen una metodología para delimitar especies de lagartijas utilizando un árbol de haplotipos con DNA mitocondrial, uno de morfología y una delimitación basada en caracteres morfológicos. La principal contribución de este trabajo es el manejo de la filogenia molecular con un énfasis en los linajes basales, por medio de los cuales describen una serie de pasos para considerar si los linajes divergentes son exclusivos a las especies putativas. Adicionalmente, la delimitación de especies está dada en base a la monofilia de los genotipos geográficamente restringidos de otros clados.

Pons *et al.* 2006, retoman el criterio de exclusividad de haplotipos del método de Wiens y Penkrot (2002) y además desarrollan un método donde analizan la longitud de ramas en base a un modelo probabilístico. En este trabajo también utiliza una filogenia

molecular basada en DNA mitocondrial de escarabajos, con la cual se ubican los nodos ancestrales que definen a las especies putativas y se evalúa el ajuste de las longitudes de ramas a un modelo de coalescencia, mediante esto se pueden proponer nuevas especies que son apoyadas también con perfiles variación de caracteres morfológicos.

Bond y Sockman(2008) integran nuevamente el método de Wiens-Penkrot a los criterios de delimitación de especies cohesivas de arañas. En este trabajo, utilizan marcadores mitocondriales y nucleares para generar un árbol en el cual se identifican los linajes basales. Posteriormente, a través de criterios de cohesión de especies se prueban hipótesis nulas para determinar si los linajes comprenden una sola especie. Aunado a estos criterios, utilizan modelaje de nicho y análisis de componentes principales para aceptar o rechazar la propuesta de ciertos linajes independientes.

Así, los criterios para la delimitación de especies combinando el uso de caracteres morfológicos, genéticos y ecológicos, conforman la taxonomía integrativa (Padial *et al.*, 2010). Para la determinación de especies nuevas es ideal contar con más de una evidencia que corrobore la divergencia de poblaciones en entidades evolutivas distintas, pero cuando no es posible acceder a más de una es posible aplicar la propuesta de especies candidatas; en primer término la especie candidata sin confirmar, la cual implica una evidencia de divergencia genética y/o morfológica pero la divergencia a nivel de linaje es inconclusa. Por otro lado, la especie candidata confirmada tiene evidencia definitiva pero el material es insuficiente para describirla (Padial *et al.*, 2010; Padial *et al.*, 2012; Vieites *et al.*, 2009).

II. OBJETIVOS

- Proponer una filogenia del género *Chiropterotriton* con base en secuencias de DNA de fragmentos mitocondriales y nucleares.
- Detectar posibles especies nuevas (especies candidato) mediante el análisis filogenético de las secuencias generadas.
- Elaborar un catálogo de las especies descritas.

III. ANTECEDENTES

El género *Chiropterotriton* pertenece a la tribu Bolitoglossini y es endémico de México, con una distribución geográfica a lo largo de la Sierra Madre Oriental (en los estados de Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Hidalgo, Querétaro y Puebla), la Faja Volcánica Transmexicana (FVT; en los estados de Querétaro, Estado de México, Distrito Federal, Hidalgo, Tlaxcala, Puebla y Veracruz) y alcanzando su distribución más al sur en la Sierra de Juárez en el norte de Oaxaca (Fig. 1; AmphibiaWeb, 2014),

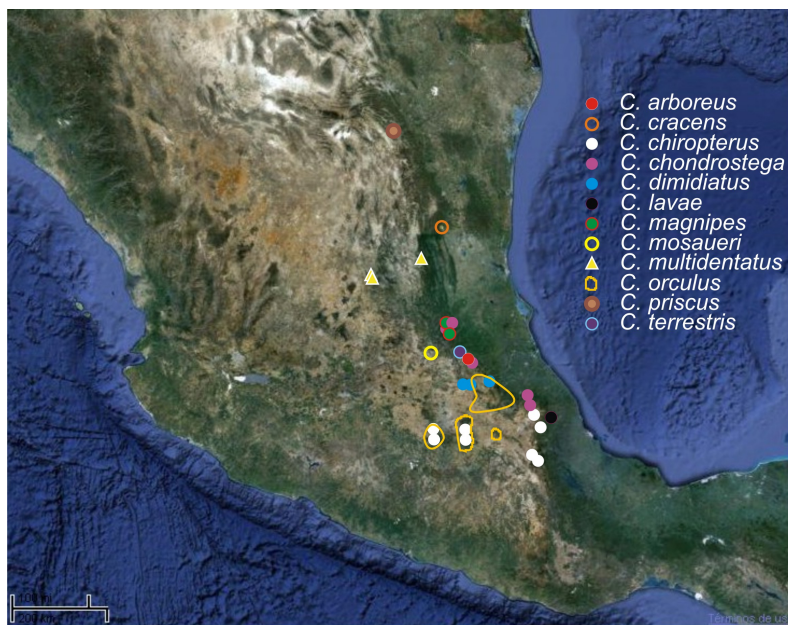


Figura 1. Mapa de distribución del género *Chiropterotriton* con sus 12 especies descritas, estas salamandras se encuentran desde Nuevo León hasta Oaxaca (AmphibiaWeb, 2014)

Este género fue reconocido en 1863, y sus especies son típicamente pequeñas (2.5-6 cm), tienen cola larga, presentan formas acrobáticas y son habitantes comunes del bosque nublado en México (Wake, 1987). Filogenéticamente están ubicadas como taxón hermano del grupo conformado por *Bolitoglossa*, *Pseudoeurycea*, *Lineatriton*, *Ixalotriton* y *Parvimolge*, y éstos a su vez como grupo hermano de *Thorius* (Wiens *et al.*, 2007).

El género *Chiropterotriton* tiene la peculiaridad de poseer una gran diversidad morfológica y ecológica que es atípica en un grupo claramente caracterizado por la estasis morfológica; la fijación de una morfología estándar a través de largos períodos de tiempo. (Wake, 1966; Wake *et al.*, 1983; Darda, 1994; Parra-Olea, 2004). *Chiropterotriton* cuenta con 12 especies descritas con hábitats y formas terrestres, arborícolas y cavernícolas, las cuales son: *C. arboreus* (Taylor, 1941), *C. chiropterus* (Cope, 1863), *C. chondrostega* (Taylor, 1941), *C. cracens* (Rabb, 1958), *C. dimidiatus* (Taylor, 1940), *C. lavae* (Taylor, 1942), *C. magnipes* (Rabb, 1965), *C. mosaueri* (Woodall, 1941), *C. multidentatus* (Taylor, 1939), *C. orculus* (Cope, 1865), *C. priscus* (Rabb, 1956) y *C. terrestris* (Taylor, 1941). La relación de las formas de vida, distribución y estatus de amenaza a las especies de *Chiropterotriton* se encuentra contenida en la Tabla 1. La especie *C. Chiropterus* le dio nombre a un complejo de especies que está representado por un grupo de poblaciones con variaciones genéticas y morfológicas, sin embargo esta especie quedó restringida a la población de Huatusco en Veracruz por Parra-Olea (2004). El resto de las poblaciones de este complejo deben reconocerse a nivel de especie y fueron denominadas preliminarmente como: spp nov. C, F, J, K, I, 15, G y H (Darda, 1994 y Parra-Olea, 2004). La lista de estas poblaciones con sus respectivas distribuciones se encuentra en la Tabla 2.

Tabla 1. Especies descritas del género *Chiropterotriton* con sus hábitos, distribución por estado, estatus en la Norma oficial mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010) y lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN).

Especie	Hábitos	Distribución	NOM	IUCN
<i>C. arboreus</i>	Arborícola	NE de Hidalgo	Pr	CR
<i>C. chiropterus</i>	Arborícola	Huatusco, Veracruz	Pr	CR
<i>C. lavae</i>	Arborícola	La Joya, Veracruz	Pr	CR
<i>C. magnipes</i>	Cavernícola	Querétaro y San Luis Potosí.	Pr	CR
<i>C. terrestris</i>	Terrestre	NE de Hidalgo	-	CR
<i>C. chondrostega</i>	Terrestre	Centro y W de Hidalgo	Pr	EN
<i>C. cracens</i>	Arborícola y Cavernícola	Sur de Tamaulipas	-	EN
<i>C. dimidiatus</i>	Terrestre	Sur de Hidalgo	Pr	EN
<i>C. multidentatus</i>	Arborícolas y Terrestres	San Luis Potosí y Tamaulipas	Pr	EN
<i>C. orculus</i>	Terrestre	Estado de Méx. y Distrito Federal	-	VU
<i>C. priscus</i>	Terrestre	Nuevo León	Pr	NT
<i>C. mosaueri</i>	Cavernícola	Hidalgo	Pr	DD

NOM: (Pr) Sujeta a protección especial

IUCN: (Cr) Peligro crítico, (EN) En peligro, (VU) Vulnerable, (NT) Casi amenazado, (DD) Datos insuficientes.

Tabla 2. Poblaciones del complejo *C. chiropterus* con sus nombres provisionales y las localidades donde han sido registradas por Darda (1994) y Parra-Olea (2004).

Especie	Localidad	Estado
<i>C. sp. 15</i>	Mineral del Chico	Hidalgo
<i>C. sp. J</i>	La Esperanza	Oaxaca
<i>C. sp. K</i>	Cerro San Felipe	Oaxaca
<i>C. sp. F</i>	Xicotepec de Juárez	Puebla
<i>C. sp. I</i>	Santa Cruz Texmalaquilla	Puebla
<i>C. sp. G</i>	Chignahuapan	Puebla
<i>C. sp. C</i>	Puerto del Aire	Veracruz
<i>C. sp. H</i>	Las Vigas	Veracruz

La filogenia del género *Chiropterotriton* hasta ahora no ha sido totalmente resuelta, y en muestreos recientes siguen apareciendo poblaciones que al parecer representan especies no descritas. La estructura filogenética basal aún no está resuelta como tampoco la determinación de clados definitivos dentro del género, al parecer falta recurrir a la

secuenciación de más genes tanto mitocondriales como nucleares (Parra-Olea, 2004). La secuenciación de genes y resolución de la filogenia del género *Chiropterotriton* es importante para completar los registros de diversidad de salamandras en México y, además para conocer los procesos evolutivos de este género que hasta ahora siguen siendo parcialmente conocidos.

En este estudio se propone una hipótesis filogenética del género *Chiropterotriton* con base en genes mitocondriales (12S, tRNA, 16S) y un gen nuclear (RAG1). Se realizaron análisis separados y concatenados para comparar las topologías que se obtuvieron mediante análisis de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana. La selección de la hipótesis propuesta está basada en la robustez y congruencia de los arboles generados. Con base en lo anterior se proponen poblaciones candidato a ser especies nuevas, lo que implica un aumento considerable en el número de especies en este género.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Muestreo taxonómico

Se obtuvieron tejidos de hígado, intestino y cola de las doce especies que hasta ahora han sido descritas para el género *Chiropterotriton*, además de representantes de cinco de las ocho poblaciones descritas por Darda (1994) y Parra-Olea (2004). También fueron incluidos tejidos de especímenes en 19 localidades de ejemplares que fueron recolectados sin poder ser descritos sólo con caracteres morfológicos. Se utilizaron especímenes de los géneros *Pseudoeurycea* y *Thorius* como grupo externo, los cuales son bolitoglosinos relacionados con *Chiropterotriton* (Wiens *et al.*, 2007). El listado del muestreo taxonómico está detallado en la Tabla 3 (Fig. 2)

Tabla 3. Muestreo de las poblaciones del género *Chiropterotriton*.

Especie	Clave	Localidad	Estado
<i>C. orculus</i>	EM902	Del. Miguel Hidalgo	Distrito Federal
<i>C. orculus</i>	EM203	Llano Grande	Estado de México
<i>C. arboreus</i>	EM601	Zacuaitipán	Hidalgo
<i>C. arboreus</i>	EM602	Zacuaitipán	Hidalgo
<i>C. arboreus</i>	EM603	Zacuaitipán	Hidalgo
<i>C. chondrostega</i>	EM609	Parque Nacional Los Mármoles	Hidalgo
<i>C. chondrostega</i>	EM103	Parque Nacional Los Mármoles	Hidalgo
<i>C. chondrostega</i>	EM104	Parque Nacional Los Mármoles	Hidalgo
<i>C. dimidiatus</i>	EM303	Mineral del Chico	Hidalgo
<i>C. dimidiatus</i>	EM117	Mineral del Chico	Hidalgo
<i>C. magnipes</i>	EM605	Parque Nacional Los Mármoles	Hidalgo
<i>C. magnipes</i>	EM606	Parque Nacional Los Mármoles	Hidalgo
<i>C. magnipes</i>	EM607	Parque Nacional Los Mármoles	Hidalgo
<i>C. mosaueri</i>	EM604	Parque Nacional Los Mármoles	Hidalgo
<i>C. mosaueri</i>	EM118	Parque Nacional Los Mármoles	Hidalgo
<i>C. terrestris</i>	EM34	Zacuaitipán	Hidalgo
<i>C. terrestris</i>	EM38	Tiangüstengo	Hidalgo
<i>C. sp</i>	EM213	Tlanchinol	Hidalgo
<i>C. sp</i>	EM313	Tlanchinol	Hidalgo
<i>C. orculus</i>	EM917	Lagunas de Zempoala	Morelos
<i>C. priscus</i>	EM403	Cerro Potosí	Nuevo León
<i>C. priscus</i>	EM404	Cerro Potosí	Nuevo León
<i>C. priscus</i>	EM405	Cerro Potosí	Nuevo León
<i>C. priscus</i>	EM406	Cerro Potosí	Nuevo León
<i>C. priscus</i>	EM407	Cerro Potosí	Nuevo León
<i>C. priscus</i>	EM408	Cerro Potosí	Nuevo León
<i>C. sp J</i>	EM410	La esperanza	Oaxaca
<i>C. sp J</i>	EM411	La esperanza	Oaxaca
<i>C. sp J</i>	EM412	La esperanza	Oaxaca
<i>C. sp J</i>	EM413	La esperanza	Oaxaca
<i>C. sp J</i>	EM614	La esperanza	Oaxaca
<i>C. sp</i>	EM922	Chilchotla	Oaxaca
<i>C. sp</i>	EM923	Chilchotla	Oaxaca
<i>C. sp</i>	EM81	Peña Verde	Oaxaca
<i>C. sp</i>	EM204	Peña Verde	Oaxaca
<i>C. sp</i>	EM206	San Bernardo	Oaxaca
<i>C. sp</i>	EM504	San Isidro Yolox	Oaxaca
<i>C. sp</i>	EM505	San Isidro Yolox	Oaxaca
<i>C. sp</i>	EM506	San Isidro Yolox	Oaxaca
<i>C. sp</i>	EM507	San Isidro Yolox	Oaxaca
<i>C. sp</i>	EM720	Sierra de Juárez	Oaxaca
<i>C. sp</i>	EM721	Sierra de Juárez	Oaxaca
<i>C. sp</i>	EM723	Sierra de Juárez	Oaxaca
<i>C. orculus</i>	EM82	Parque Nacional Izta-Popo	Puebla
<i>C. orculus</i>	EM219	Parque Nacional Izta-Popo	Puebla
<i>C. orculus</i>	EM205	Parque Nacional Izta-Popo	Puebla
<i>C. sp F</i>	EM508	Cuetzalan	Puebla
<i>C. sp G</i>	EM911	Chignahuapan	Puebla

<i>C. sp G</i>	EM912	Chignahuapan	Puebla
<i>C. sp G</i>	EM913	Chignahuapan	Puebla
<i>C. sp</i>	EM714	Pahuatlán del Valle	Puebla
<i>C. sp</i>	EM716	Pahuatlán del Valle	Puebla
<i>C. sp</i>	EM717	Pahuatlán del Valle	Puebla
<i>C. sp</i>	EM719	Pahuatlán del Valle	Puebla
<i>C. sp</i>	EM810	Tlatlauquitapan	Puebla
<i>C. sp</i>	EM811	Tlatlauquitapan	Puebla
<i>C. sp</i>	EM813	Tlatlauquitapan	Puebla
<i>C. sp</i>	EM814	Tlatlauquitapan	Puebla
<i>C. sp</i>	EM907	Zacatlán	Puebla
<i>C. sp</i>	EM908	Zacatlán	Puebla
<i>C. sp</i>	EM214	Hueyapan	Puebla
<i>C. sp</i>	EM215	Hueyapan	Puebla
<i>C. sp</i>	EM216	Hueyapan	Puebla
<i>C. sp</i>	EM217	Hueyapan	Puebla
<i>C. multidentatus</i>	EM526	Cd. del Maíz	San Luis Potosí
<i>C. multidentatus</i>	EM527	Cd. del Maíz	San Luis Potosí
<i>C. multidentatus</i>	EM528	Cd. del Maíz	San Luis Potosí
<i>C. multidentatus</i>	EM529	Cd. del Maíz	San Luis Potosí
<i>C. multidentatus</i>	EM530	Cd. del Maíz	San Luis Potosí
<i>C. multidentatus</i>	EM905	Rancho Borbortón	San Luis Potosí
<i>C. multidentatus</i>	EM114	Sierra de Álvarez	San Luis Potosí
<i>C. multidentatus</i>	EM115	Sierra de Álvarez	San Luis Potosí
<i>C. sp</i>	EM610	Trinidad	San Luis Potosí
<i>C. sp</i>	EM611	Trinidad	San Luis Potosí
<i>C. sp</i>	EM920	Xilitla	San Luis Potosí
<i>C. sp</i>	EM921	Xilitla	San Luis Potosí
<i>C. cracens</i>	EM513	El Cielo	Tamaulipas
<i>C. sp</i>	EM515	El Cielo	Tamaulipas
<i>C. sp</i>	EM516	El Cielo	Tamaulipas
<i>C. sp</i>	EM517	El Cielo	Tamaulipas
<i>C. sp</i>	EM518	El Cielo	Tamaulipas
<i>C. sp</i>	EM519	El Cielo	Tamaulipas
<i>C. sp</i>	EM520	El Cielo	Tamaulipas
<i>C. sp</i>	EM521	El Cielo	Tamaulipas
<i>C. sp</i>	EM522	El Cielo	Tamaulipas
<i>C. sp</i>	EM523	El Cielo	Tamaulipas
<i>C. sp</i>	EM524	El Cielo	Tamaulipas
<i>C. sp</i>	EM525	El Cielo	Tamaulipas
<i>C. sp</i>	EM531	El Cielo	Tamaulipas
<i>C. sp</i>	EM918	Tlaxco	Tlaxcala
<i>C. sp</i>	EM919	Tlaxco	Tlaxcala
<i>C. sp C</i>	EM503	Puerto Aire	Veracruz
<i>C. chiropterus</i>	Ejo77	Huatusco	Veracruz
<i>C. chiropterus</i>	Ejo78	Huatusco	Veracruz
<i>C. sp H</i>	EM415	Las Vigas	Veracruz
<i>C. sp H</i>	EM416	Las Vigas	Veracruz
<i>C. lavae</i>	EM84	La Joya	Veracruz
<i>C. lavae</i>	EM86	La Joya	Veracruz
<i>C. lavae</i>	EM87	La Joya	Veracruz

<i>C. lavae</i>	EM424	La Joya	Veracruz
<i>C. lavae</i>	EM425	La Joya	Veracruz
<i>C. lavae</i>	EM426	La Joya	Veracruz
<i>C. lavae</i>	EM428	La Joya	Veracruz
<i>C. lavae</i>	EM429	La Joya	Veracruz
<i>C. lavae</i>	EM430	La Joya	Veracruz
<i>C. lavae</i>	EM509	La Joya	Veracruz
<i>C. lavae</i>	EM510	La Joya	Veracruz
<i>C. lavae</i>	EM511	La Joya	Veracruz
<i>C. lavae</i>	EM512	La Joya	Veracruz
<i>C. sp</i>	Ejo711	Banderilla	Veracruz
<i>C. sp</i>	Ejo715	Banderilla	Veracruz
<i>C. sp</i>	EM909	Huayacocotla	Veracruz
<i>C. sp</i>	Ejo717	Tlalhueyocan	Veracruz
<i>C. sp</i>	JLAL535	Tlalhueyocan	Veracruz
<i>C. sp</i>	EM310	Xometla	Veracruz
<i>C. sp</i>	EM311	Xometla	Veracruz
<i>C. sp</i>	EM904	Zilacatipan	Veracruz

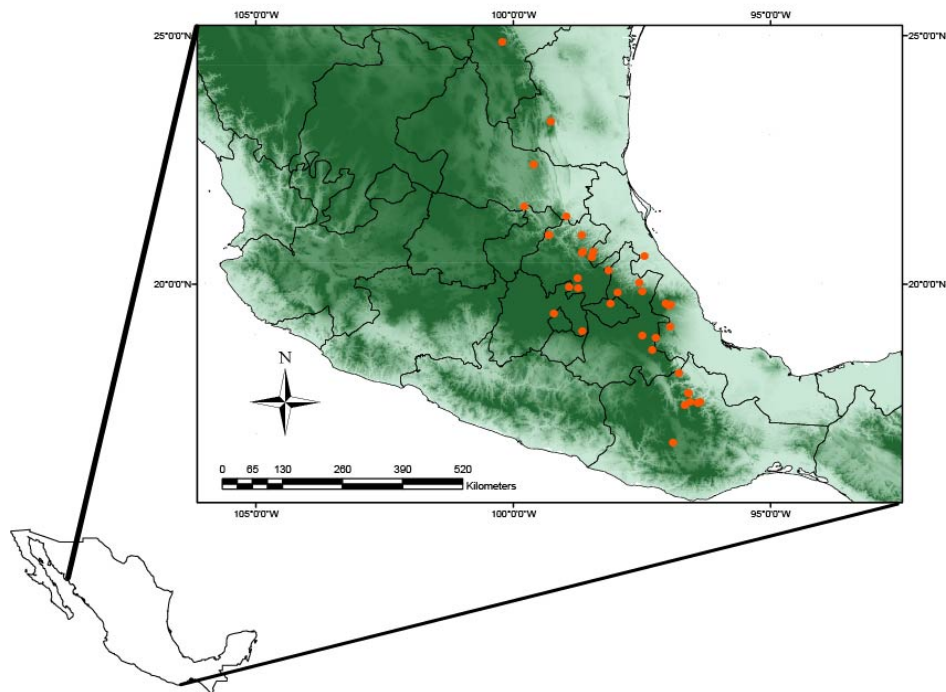


Figura 2. Muestreo del género *Chiropterotriton* en 39 localidades cubriendo la distribución reportada.

4.2 Protocolos de laboratorio

La extracción de DNA genómico se realizó con el kit de extracción “DNeasy Blood & Tissue kit” (QIAGEN), conforme las instrucciones del proveedor. Se obtuvieron un total

de 117 extracciones y estos productos se corrieron en gel de agarosa para corroborar la cantidad y calidad de las muestras.

El marcador mitocondrial empleado fue el fragmento mitocondrial “L2” que incluye los genes 12S, 16S y tRNA de Zhang *et al.* (2008). Las 117 muestras se amplificaron utilizando el siguiente programa de PCR: 35 ciclos a 96°C por 2 minutos, la alineación del oligo a 55°C (L2) y 45°C (C2) por 1 minuto, extensión de la cadena a 72°C por 5 minutos. De la misma manera se empleó un marcador nuclear Rag1 (San Mauro *et al.*, 2004) amplificando un total de 44 especímenes, cada uno en un volumen de 25µl con 35 ciclos; 95°C por 3 minutos, la alineación a 61°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 5 minutos. La lista de los oligonucleótidos utilizados se encuentra contenida en la Tabla 4. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa para corroborar la amplificación de las muestras.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los fragmentos mitocondriales (Zhang *et al.*, 2008) y nucleares (San Mauro *et al.*, 2004).

Locus	Nombre	Secuencia (5'-3')	Longitud aproximada (pb)
L2 (16S, tRNA, 12S)	LX12SN1	TACACACCGCCCGTCA	1600
	LX16S1R	GACCTGGATTACTCCGGTCTGAACTC	
Rag1	Sal-RAG1.F	CACYGGGCGCCAGATYTTCCARCC	900
	Sal-RAG1.R1	AGGTTCTCAGTGTGGCTCCTGGTGA	

Los productos de PCR fueron enviados al servicio de secuenciación del High-Throughput Genomics Unit en Seattle, Washington, USA, donde utilizaron un secuenciador automático ABI Prism 3730xl (Applied Biosystems).

4.3 Análisis de datos

La edición y ensamble de las secuencias se llevó a cabo en Sequencher 5.0.1 (Gene codes corporation) donde se generó una matriz que posteriormente fue alineada a través de Muscle 3.8 (Robert, 2004). Los alineamientos para cada fragmento fueron revisados manualmente con Mesquite versión 2.75 (Maddison y Maddison, 2009).

Se delimitaron tres particiones para el fragmento mitocondrial correspondiente a los genes 12S, tRNA y 16S, así como primera, segunda y tercera posición del codón para el gen nuclear codificante RAG1 (Tabla 5). La selección del modelo de sustitución se llevó a cabo bajo el Criterio de Información Akaike (AIC) en el programa MrModeltest 2.2 (Nylander, 2004). El modelo de evolución de cada partición está detallado en la Tabla 5.

Tabla 5. Modelos con el mejor ajuste para el fragmento mitocondrial L2 y el nuclear RAG1 obtenidos con MrModelTest 2.2.

Partición	Modelo
L2 (12S)	GTR+I+G
L2(tRNA)	GTR+G
L2(16S)	GTR+G
Rag1 1ª posición	K80+G
Rag1 2ª posición	GTR+I+G
Rag1 3ª posición	K80+G

Se implementaron dos análisis filogenéticos; Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana. El análisis de máxima verosimilitud se realizó a través de RaxML (Stamatakis, 2006) utilizando el modelo de sustitución GTR+Gamma, además se obtuvieron valores de apoyo de ramas bootstrap con 1000 réplicas.

El análisis de inferencia bayesiana fue implementado en el software MrBayes 3.1.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003). Se corrieron análisis con 20,000,000 de generaciones, la frecuencia de muestreo fue cada 1,000 generaciones, con dos corridas de cuatro cadenas cada una y el árbol final se obtuvo mediante un consenso de mayoría. Asimismo, se revisó

la convergencia y estabilidad de las cadenas con Tracer v.1.5 (Rambaut y Drummond, 2007). El apoyo estadístico de las ramas se estimó con probabilidad posterior. La observación y edición de todos los árboles obtenidos fue realizada en FigTree v1.3.1(Rambaut, 2006).

En total se realizaron seis análisis filogenéticos, es decir que se aplicaron los dos métodos antes mencionados para cada marcador y el análisis concatenado. Se obtuvieron distancias genéticas Kimura2-parámetros a través de PAUP*4.0 (Swofford, 2002) con base en la matriz concatenada (Anexo 1). Se obtuvo un árbol de especies a partir de la matriz concatenada en el programa BEAST v.1.7.1 (Drummond y Rambaut, 2007). Se utilizaron 37 taxones seleccionados a partir de los árboles generados para cada marcador y una secuencia de *Pseudoeurycea* como grupo externo. Las particiones y modelos de sustitución fueron los mismos que los implementados en MrBayes y se corrieron 20,000,000 de generaciones con muestreo de árboles cada 1,000 generaciones, descartando 5,000 de éstas como burn-in.

4.4 Delimitación de especies candidato

Este trabajo fue realizado con base en caracteres moleculares, por lo que las propuestas de especies candidato quedan a la espera de la corroboración de caracteres morfológicos y/o ecológicos que apoyen o rechacen esta hipótesis. El principal supuesto es la consideración de especie como una metapoblación que evoluciona en un linaje independiente (de Queiroz, 2007), en base a esto se utilizaron tres principales criterios para la propuesta de especies candidato.

Los criterios concretos para delimitar especies del género *Chiropterotriton* en base a una filogenia molecular fueron: 1) Posición filogenética: se identifican los haplotipos exclusivos de las especies putativas (Wiens y Penkrot, 2002) que pueden ser linajes

independientes. 2) Monofilia de genotipos: una vez identificados los haplotipos exclusivos de las especies ya descritas, se evaluó la monofilia de aquellos genotipos que estén geográficamente restringidas de otros clados. El aislamiento por distancia geográfica es un factor común en el origen de linajes independientes, en el caso particular de estas salamandras se conoce su baja capacidad de dispersión, así como su alto grado de endemismos (Darda, 1994; Myers *et al.*, 2000; Parra-Olea, 2004). 3) Estructura geográfica: se evalúa la concordancia del árbol filogenético y la localización geográfica de los haplotipos. Si la estructura geográfica no es clara, entonces puede tratarse de un separación incompleta de linajes o de una especie ampliamente distribuida con presencia de flujo génico (Wiens y Penkrot, 2002; Bond y Sockman, 2008).

La asignación de especies candidatas se realizó tal como en la publicación de Padial *et al.* (2012), las poblaciones fueron nombradas como *Chiropterotriton Ca* acompañada de una numeración.

V. Resultados

Marcador mitocondrial

La hipótesis filogenética generada con los marcadores mitocondriales (12S, tRNA y 16S) sugiere en ambos análisis filogenéticos (Fig. 3 y 4) la presencia de dos clados principales en el género *Chiropterotriton*. Este agrupamiento ya había sido registrado en los trabajos previos a este estudio (Darda, 1994; Parra-Olea, 2004), donde los clados corresponden a las partes norteña y sureña de la distribución de este género.

Los arboles generados con los dos tipos de análisis filogenéticos tienen bien definidos los agrupamientos norte y sur. El clado I (subclados: a, b, c, d, e, f, g) incluye a las especies *C. priscus*, *C. cracens*, *C. multidentatus*, *C. arboreus*, *C. terrestris*, *C. chondrostega* y *C. magnipes*. Adicionalmente, este clado contiene taxones con una posición filogenética excluyente con respecto a las especies ya descritas que se encuentran señaladas como las siguientes poblaciones: El cielo (Tamaulipas), Pahuatlán (Puebla), Trinidad (San Luis Potosí), Xilitla (San Luis Potosí), Tlanchinol (Hidalgo) y Zilacatipan (Veracruz).

Por su parte, el clado II (subclados: h, i, j, k, l, m, n, o, p, q) incluye a las especies *C. mosaueri*, *C. dimidiatus*, *C. lavae*, *C. orculus*, *C. chiropterus*, más cinco de las especies sugeridas como nuevas en el trabajo de Darda (1994) *C. sp C*, *C. sp F*, *C. sp H* y *C. sp J*, las cuales aún permanecen sin ser descritas formalmente. Este grupo también incluye los taxones correspondientes a las poblaciones de Tlaxco (Tlaxcala), Tlatlauquitepec (Puebla), Zacatlán (Puebla), Hueyapan (Puebla), Xometla (Veracruz), Tlalnehuayocan (Veracruz), Banderilla (Veracruz), Chilchotla (Oaxaca), La esperanza (Oaxaca), Peña Verde (Oaxaca), Sierra de Juárez (Oaxaca).

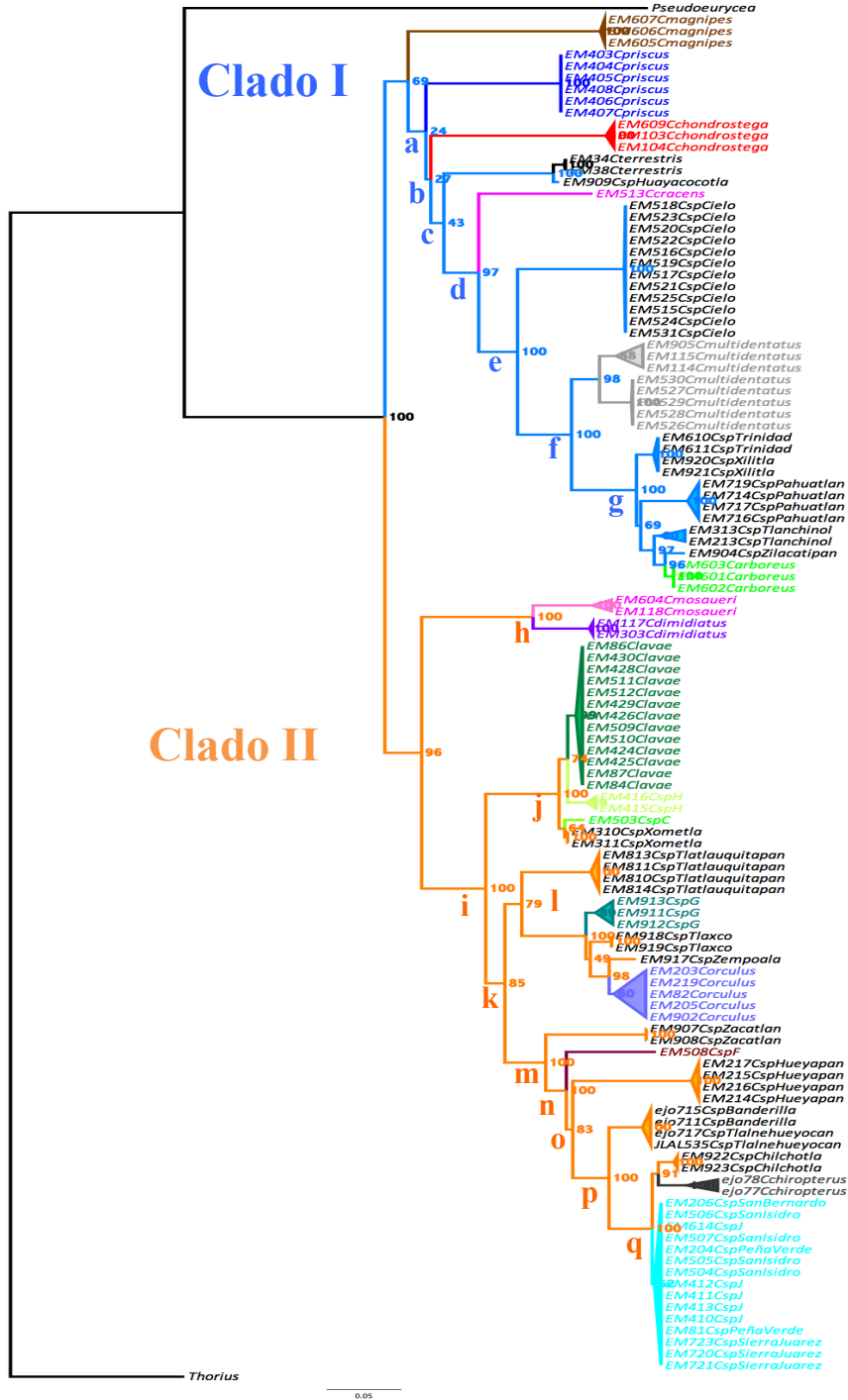


Figura 3. Árbol de máxima verosimilitud ($-\ln L=14195.97$) de los genes mitocondriales 12S, tRNA y 16S. Apoyo de ramas bootstrap con 1000 réplicas. La filogenia incluye 117 taxa agrupados en dos clados principales; Clado I (azul) y Clado II (naranja) que a su vez incluyen a los subclados a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, q. Las especies descritas se encuentran ilustradas en colores, mientras que los taxones exclusivos y grupo externo se encuentran en color negro.

Las topologías generadas con los análisis filogenéticos de máxima verosimilitud (ML) e inferencia bayesiana (IB) resultaron similares, sin embargo existen algunas diferencias en las relaciones basales del Clado I; los subclados a y b del árbol de máxima verosimilitud no se recuperaron en el de inferencia bayesiana, la posición de *C. magnipes*, *C. priscus* y *C. chondrostegavarían* entre los dos análisis y presentan valores bajos de apoyo de ramas. Por su parte, la posición de *C. terrestris* se mantiene igual en ambos árboles aunque con bajos valores de apoyo (Fig. 3 y 4). El resto del árbol de inferencia bayesiana es igual al de máxima verosimilitud, recuperando 15 de los 17 subclados.

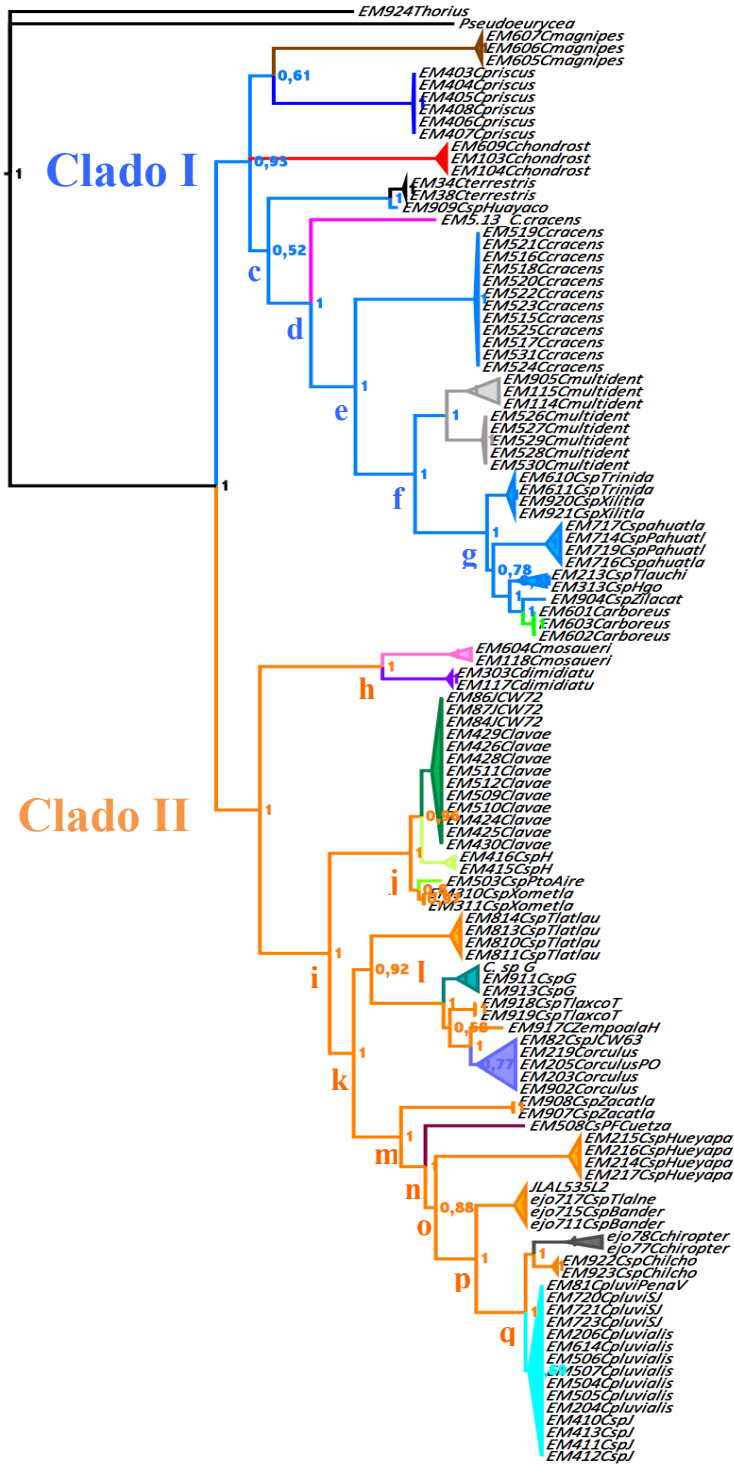


Figura 4. Árbol de consenso de mayoría en inferencia bayesiana de los genes mitocondriales 12S, tRNA y 16S. Apoyo de ramas de probabilidades posteriores. Esta filogenia contiene 117 taxones que se agrupan en dos clados principales (Clado I: azul y II: naranja), recuperando la mayoría de los subclados obtenidos con Máxima Verosimilitud (Excepto subclados a y b, Figura 3). Las especies descritas se encuentran ilustradas en colores, mientras que los taxones exclusivos y grupo externo se encuentran en color negro. **Marcador nuclear**

Los árboles generados con el marcador nuclear (RAG1) fueron distintos en cada análisis, esto se debe principalmente a que este fragmento resultó muy conservado y con pocos caracteres filogenéticos informativos. Además, las diferentes topologías son resultado de dos análisis distintos que manejan de manera diferente los modelos de sustitución y particiones asociados a este fragmento. En el caso del análisis de ML solo se puede aplicar uno de los modelos más complejos (GTR) en una sola partición, cuando en realidad el programa MrModeltest arrojó como mejor modelo más sencillo (K80+G) para la primera y tercera posiciones del codón. La inferencia Bayesiana considera particiones y la asociación un modelo de sustitución para cada partición, sin embargo los valores de apoyo de ramas fueron bajos y hay presencia de numerosas politomías en la topología.

Similar a lo observado con el fragmento mitocondrial, los análisis ML e IB del marcador nuclear arrojaron un árbol con dos clados principales (Clado I y II) pero con bajos valores de apoyo, presencia de politomías y una topología donde *C. mosaueri* y la población de Pahuatlán, Puebla se agrupan en el clado norte y sur respectivamente (Fig. 5 y 6). Por las características de estos resultados es posible decir que las relaciones filogenéticas de este grupo no son fáciles de hipotetizar a partir únicamente de los árboles generados con el marcador nuclear dada su baja resolución.

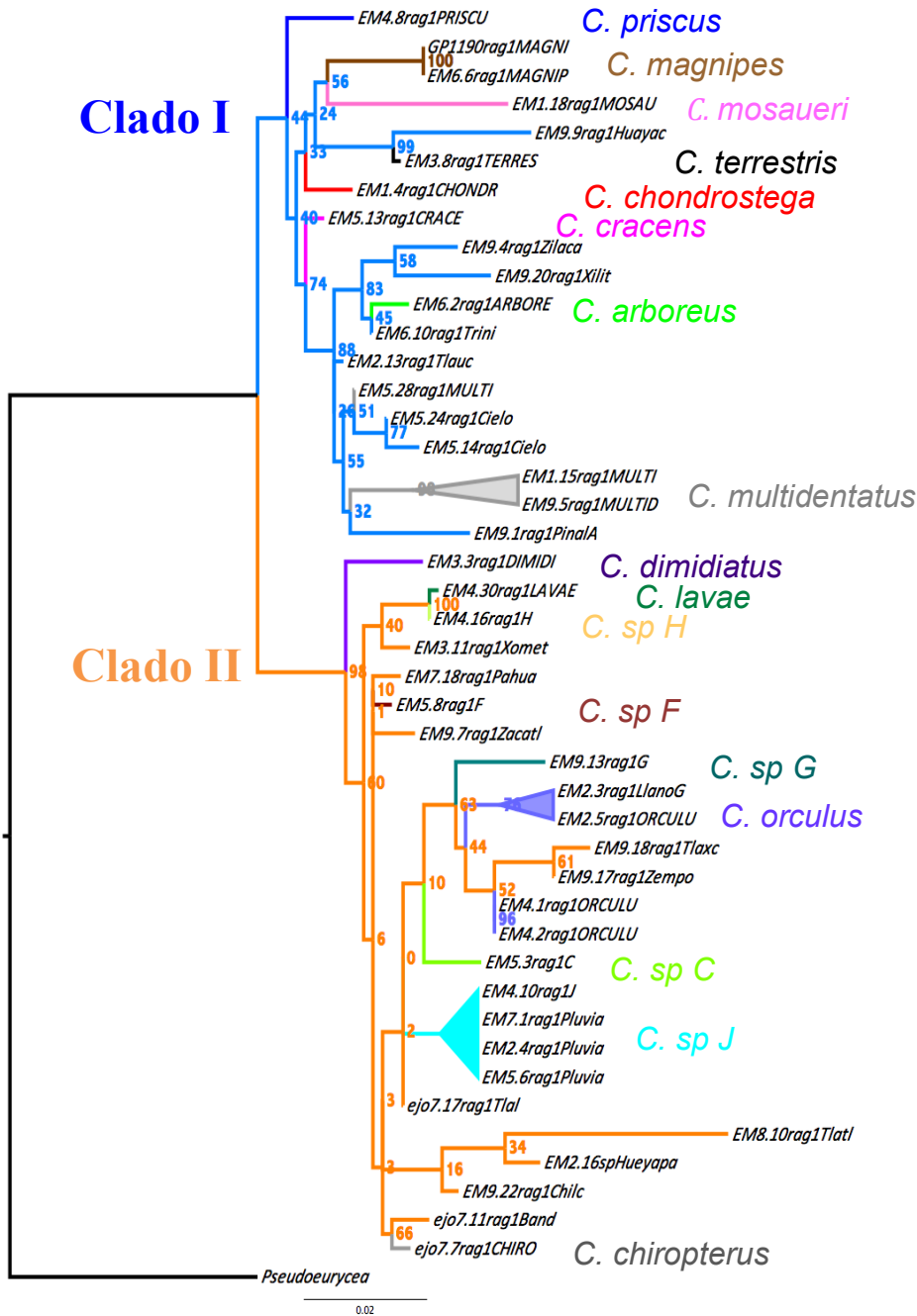


Figura 5. Árbol de máxima verosimilitud ($-\ln L = 2960.70$) del fragmento del gen nuclear RAG1. Apoyo de ramas bootstrap con 1000 réplicas. Esta filogenia incluye 45 taxones agrupados en dos clados; Clado I (azul) que corresponde a la distribución norteña del género *Chiropterotriton* y el Clado II (naranja) que ilustra las especies sureñas de este grupo, similar al agrupamiento de la filogenia mitocondrial con excepción de posición de la especie *C. mosaueri* y la población de Pahuatlán. Además, este árbol presenta bajos valores de apoyo en la mayoría de las ramas y hay politomías que reflejan lo poco informativo que es este fragmento para este grupo en particular. No se recupera ningún subclado de los observados en el fragmento mitocondrial.

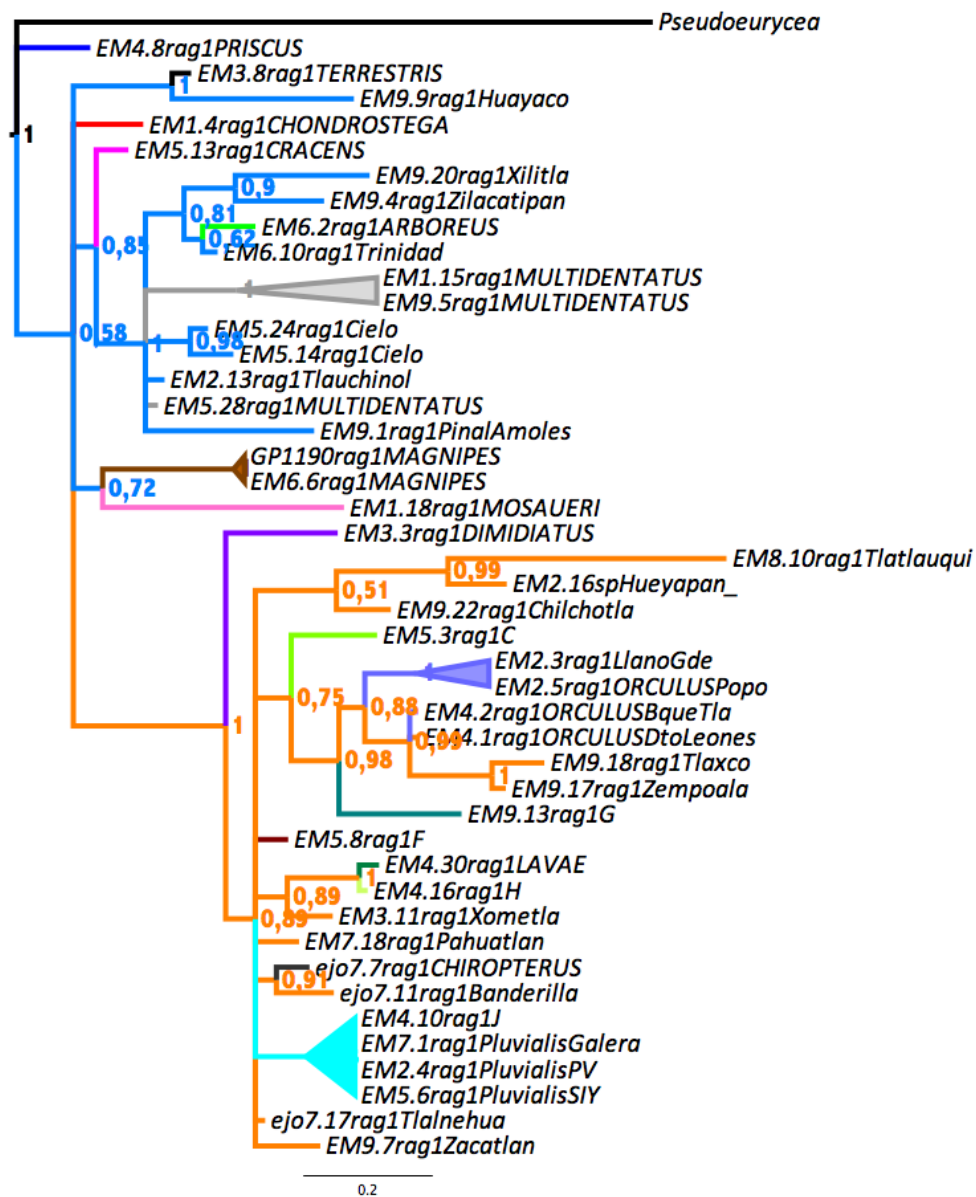


Figura 6. Árbol de consenso de mayoría de inferencia bayesiana del gen RAG1, con apoyo de ramas de probabilidades posteriores. Incluye 45 taxones que no están claramente agrupados en dos clados como en los análisis anteriores. De manera parcial, se recuperan el Clado I (azul) y el Clado II (naranja). A diferencia del análisis de ML, éste tiene mejores valores de apoyo, sin embargo también hay presencia de politomía y la exclusión de la especie *C. priscus* del resto del género *Chiropterotriton*.

Análisis concatenados

La unión de las matrices de secuencias de distintos marcadores suelen aportar una mayor robustez a las inferencias filogenéticas (Edwards, 2009). Las hipótesis generadas a partir de una supermatriz con ambos marcadores fueron distintas entre los dos tipos de análisis (Fig. 7 y 8) y esta matriz fue la base para la obtención de las distancias pareadas (Anexo 1).

Los análisis de ML concatenado (Fig. 7) y el mitocondrial (Fig. 3) son similares, se observan dos clados principales (I y II) correspondientes a la distribución norte y sur de los haplotipos, además coinciden en 16 de los 17 subclados. Las diferencias puntuales entre estos son: apoyo de ramas más bajos en el concatenado, que son notables en el Clado I (Tabla 6). Así mismo, hay menor resolución en la parte basal del concatenado, el cual no recupera un subclado; aparece un clado basal con *C. priscus* y *C. magnipes* mientras que en el árbol mitocondrial aparece únicamente *C. magnipes* como basal del Clado I.

La hipótesis generada a partir del análisis de IB nos da un árbol que no está claramente resuelto, sobretodo en la base donde hay una politomía (Fig. 8). Considerando los clados observados con el árbol mitocondrial de ML (Fig. 3), el árbol concatenado de IB recupera solo uno de los clados principales (Clado II) y 14 subclados (d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, q). Una diferencia notable en cuanto a la posición filogenética de las especies de este género es la inclusión de *C. terrestris* en el agrupamiento sur o Clado II.

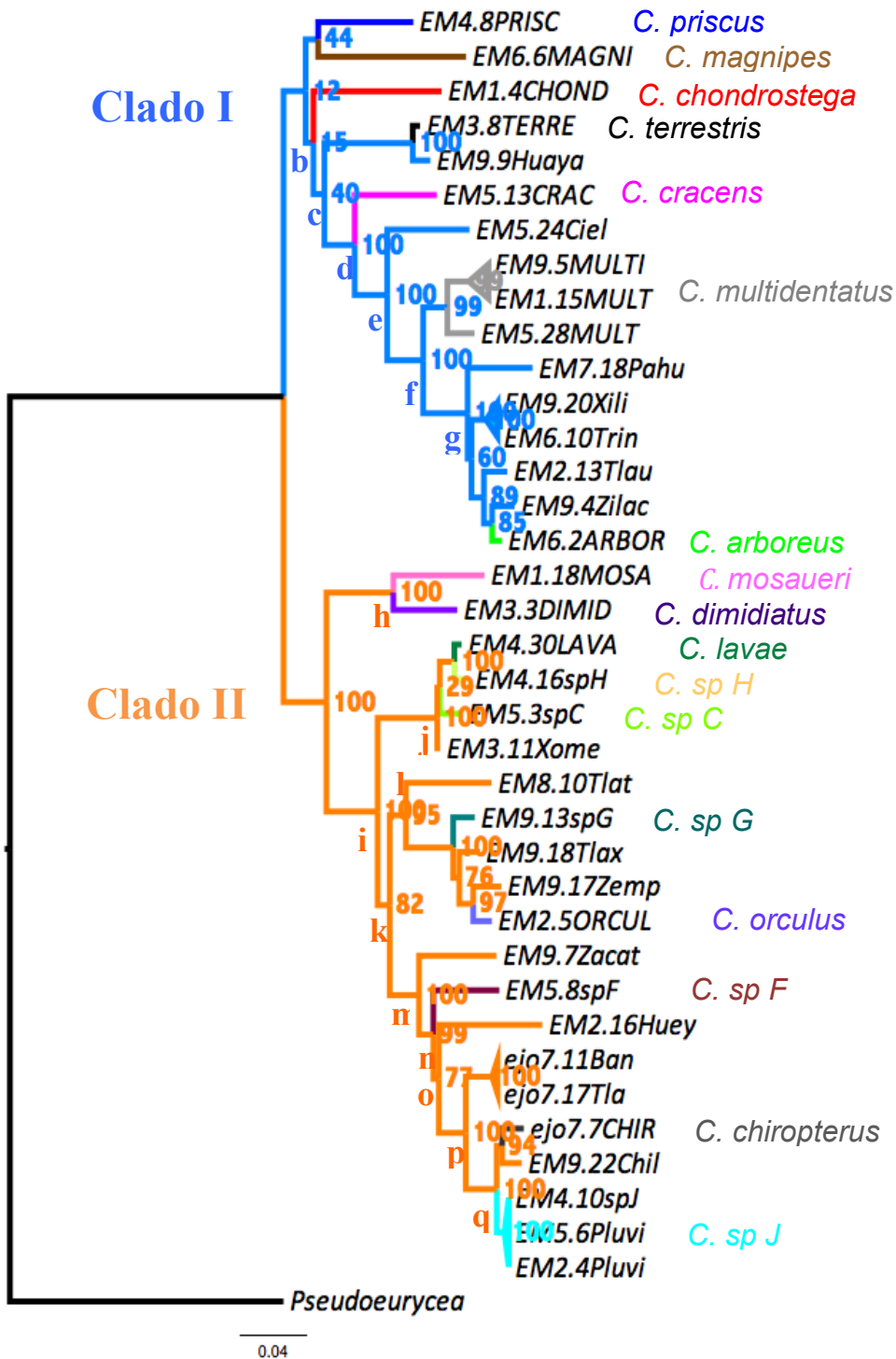


Figura 7. Árbol de máxima verosimilitud ($-\ln L = 15510.41$) de los genes mitocondriales 12S tRNA y 16S y el nuclear Rag1. Apoyo de ramas bootstrap con 1000 réplicas. La filogenia incluye 38 taxones que se dividen en Clado I (azul) y Clado II (naranja), los cuales incluyen 16 subclados (b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, q). Las especies putativas se encuentran ilustradas en colores mientras que los taxones exclusivos y grupo externo se encuentran en color negro.

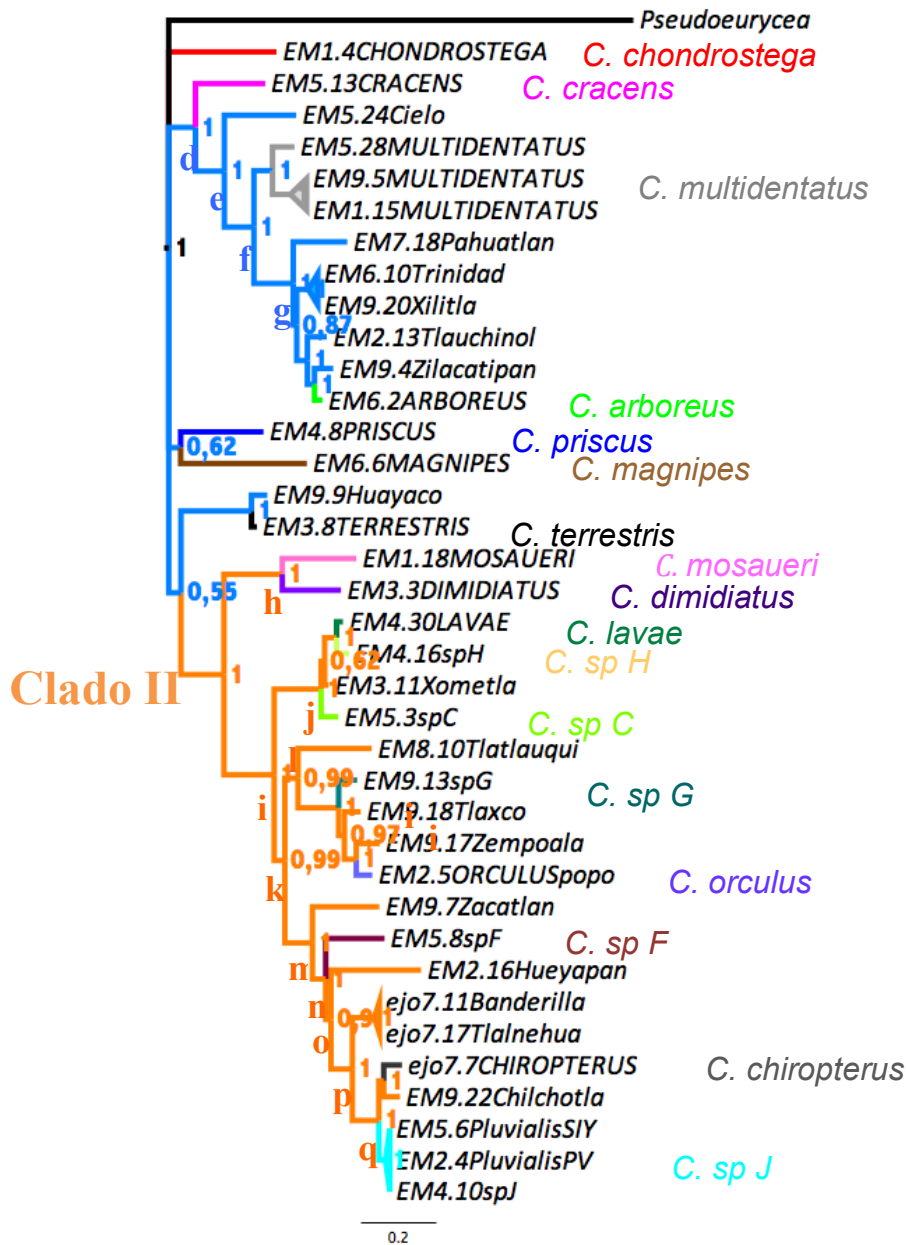


Figura 8. Árbol de consenso de mayoría de inferencia bayesiana de los genes mitocondriales 12S tRNA y 16S y el nuclear Rag1. Apoyo de ramas de probabilidades posteriores. Filogenia con 38 taxones que se observan agrupados en tres clados principales, recuperando 14 de los subclados observados en el análisis mitocondrial.

Tabla 6. Muestra el resumen comparativo de los seis análisis filogenéticos realizados en este estudio para el género *Chiropterotriton*. En ella se observan los clados observados y el apoyo de ramas obtenidos en cada análisis.

Clados	Mitocondriales (BS/PP)	Nucleares (BS/PP)	Concatenados (BS/PP)
I	69/0.93	44/-	12/-
II	96/1	98/-	100/1
a	24/-	-/-	-/-
b	27/-	-/-	15/-
c	43/0.52	-/-	40/-
d	97/1	-/-	100/1
e	100/1	-/-	100/1
f	100/1	-/-	100/1
g	100/1	-/-	100/1
h	100/1	-/-	100/1
i	100/1	-/-	100/1
j	100/1	-/-	100/1
k	85/1	-/-	82/0.99
l	79/0.92	-/-	95/0.99
m	100/1	-/-	100/1
n	100/1	-/-	99/1
o	83/0.88	-/-	77/0.9
p	100/1	-/-	100/1
q	100/1	-/-	100/1

BS= Bootstrap de máxima verosimilitud

PP= Probabilidades posteriores de inferencia bayesiana

- = Clado no recuperado

Hipótesis filogenética

- Clado I

El género *Chiropterotriton* se encuentra agrupado en dos clados principales (Fig. 9) con una divergencia de hasta 13.6%. La conformación de cada clado está dada tal cual se mencionó anteriormente en el análisis del fragmento mitocondrial y corresponde a la distribución norte de este género, desde el estado de Nuevo León hasta el de Hidalgo.

El clado I no tiene buena resolución en la base. *Chiropterotriton priscus* es la especie con la distribución geográfica más norteña del grupo y aparece claramente en la base de este clado en el árbol del marcador nuclear (Fig. 5 y 6), en contraste con los resultados con los árboles del fragmento mitocondrial y concatenado donde existen valores bajos de apoyo que involucran también a *C. magnipes*, *C. chondrostega* y *C. terrestris*. Sin embargo, la hipótesis mitocondrial es la que tiene el mejor apoyo de ramas y posiciona a *C. magnipes* como basal al Clado I. Por otra parte, en el subclado “c” se encuentra *C. terrestris* y la población de Huayacocotla, Veracruz, se agrupan cercanamente en la filogenia y en distancia genética (0.013), lo que contrasta con la distancia geográfica (<100km) entre ambas poblaciones, sin embargo faltaría evidencia morfológica y/o ecológica para determinarlas como linajes independientes, por cual la población de Huayacocotla se asocia a la especie *C. terrestris*.

Las relaciones filogenéticas se encuentran mejor apoyadas a partir del subclado “d”, en la mayoría de los análisis. *Chiropterotriton cracenses* simpátrico de la población de El Cielo, Tamaulipas, sin embargo por la posición filogenética y exclusión clara de los haplotipos que incluso son parte de distintos subclados (d y e), se sugiere que son especies distintas por lo tanto a la población del El Cielo se le considera especie candidata confirmada *Chiropterotriton. ca 1*.

En el subclado “f” se encuentra *Chiropterotriton multidentatus*, especie que presenta subdivisiones dentro su propio clado, la distancia filogenética entre la población de Rancho Borbotón y Sierra de Álvarez, San Luis Potosí, es corta pero éstas presentan una distancia mayor con respecto a la población de Cd. Maíz, San Luis Potosí; probablemente estos linajes se encuentren en un proceso de divergencia por aislamiento reciente de sus poblaciones.

En el subclado “g” encontramos a la población de Pahuatlán, Puebla que se sugiere como *C. ca 2* ya que reúne la evidencia filogenética y geográfica para ser considerada como un linaje evolutivo independiente. Las poblaciones Trinidad y Xilitla, San Luis Potosí también son propuestas como *C. ca 3*, ya que existe entre ellas una exclusividad de haplotipos que las mantiene separadas de la población de Pahuatlán, Puebla, además existe un aislamiento geográfico evidente. *Chiropterotriton arboreus* se encuentra cercanamente relacionado con la población de Zilacatipan, Veracruz que se encuentra a una distancia de 20km. Del mismo modo, la población de Tlanchinol, Hidalgo se encuentra cercana filogenéticamente a *C. arboreus* y se ubica a 40 km de la localidad de esta especie. La posibilidad de que sean una sola especie deberá ser corroborada mediante comparación de caracteres morfológicos y/o ecológicos.

- Clado II

Este clado tiene una correspondencia geográfica desde el estado de Hidalgo al estado de Oaxaca. En este se incluye el subclado “h” donde se agrupan *Chiropterotriton dimidiatus* y *C. mosaueri* como especies hermanas. El subclado “i” diverge en dos subclados que son el “j” y “k”; la población de Xometla, Veracruz, se encuentra en la base del subclado “j” que incluye a *C. sp C*, *C. lavae* y *C. sp H*. La población de Xometla, Veracruz, se encuentra filogenética y geográficamente muy cercana a la especie *C. sp C* de Puerto Aire, Veracruz por lo cual se propone parte de la misma a reserva de corroborar alguna diferenciación morfológica y/o ecológica. Por su parte, *C. lavae* se encuentra estrechamente relacionada con *C. sp H*, en este caso Darda (1994) las describe como ejemplares morfológicamente muy distintos a pesar de ser simpátricos; sin embargo a nivel molecular quedan muy cercanos, por ello la especie *C. sp H* queda a la espera de una corroboración morfológica.

En el subclado “k” se subdivide en el subclado “l” en el cual se agrupan todas las poblaciones distribuidas en del centro de la Faja Volcánica Transmexicana. La población de Tlatlauquitepec, Puebla es la población basal de este subclado y tiene una diferenciación filogenética que permiten designarla como *C. ca 4*. Por otra parte, la especie *C. sp G* distribuida en Chignahuapan, Puebla, se encuentra en una posición cercana a *C. orculus* y la población de Tlaxco, Tlaxcala. La cercanía de estas dos últimas sugieren que son parte del mismo grupo de poblaciones que conforman la especie *C. orculus*. Esta especie quedó restringida por Parra-Olea (2004) a las localidades en la periferia de la Ciudad de México. En el análisis con el marcador mitocondrial se incluyen varias poblaciones que se agrupan con distancias genéticas cortas aunque aparentemente si existe un aislamiento entre ellas. En el análisis concatenado se usaron dos secuencias de distintas localidades para resolver la posición filogenética de esta especie, aunque bien podría tratarse de un complejo de especies; un análisis más detallado de estas poblaciones es necesario para resolver este complejo.

En el subclado “m” está la población de Zacatlán, Puebla, la cual se encuentra muy cercana geográficamente con la especie *C. sp G*, sin embargo la posición filogenética entre ellas es notablemente distante (como en el caso de la población de El Cielo y *C. cracens*), por lo que se sugiere que la población de Zacatlán sea *C. ca5*.

El subclado “n” incluye a la especie *C. sp F*, la cual fue registrada en la localidad de Xicotepec de Juárez, Puebla, sin embargo el ejemplar que fue utilizado en este estudio fue recolectado en la zona de Cuetzalan, Puebla; la identificación y correspondencia de la secuencia fue corroborada mediante un Blast en el portal del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

El subclado “o” incluye a la población de Hueyapan, Puebla, la cual también se sugiere como especie candidata *C. ca 6* por su posición filogenética y distribución geográfica con respecto a su clado hermano (subclado “p”) que comprende de taxones del área Veracruz-Oaxaca.

El subclado “p” incluye las poblaciones de Banderilla y Tlalnehuayocan, Veracruz, las cuales se mantienen muy cercanas filogenética y geográficamente por lo que ambas corresponden a un mismo linaje y es considerada como *C. ca 7*.

El subclado “q” posee las poblaciones más sureñas en el norte de Veracruz y Oaxaca. Este se agrupa la especie *C. chiropterus* que está cercanamente relacionada con la población de Chilchotla, Oaxaca, aunque con una amplia distancia geográfica (95 km). En este caso se requiere de una comparación morfológica y/o ecológica para delimitar la especie con mayor evidencia, ya que la especie *C. chiropterus* está restringida a la población de Huatusco, Veracruz. Finalmente, encontramos los haplotipos de la especie *C. sp. J* y poblaciones de Peña Verde y Sierra de Juárez, Oaxaca, la divergencia entre ellas es muy baja por lo que todas quedarían asignadas a *C. sp J*.

Con base en lo anterior, se sugiere un árbol de especies que incluye las especies descritas, las delimitadas en trabajos anteriores y especies candidatas (Fig. 9). El listado de las especies descritas, no descritas, poblaciones asociadas a especies descritas y especies candidato se encuentra en la Tabla 7.

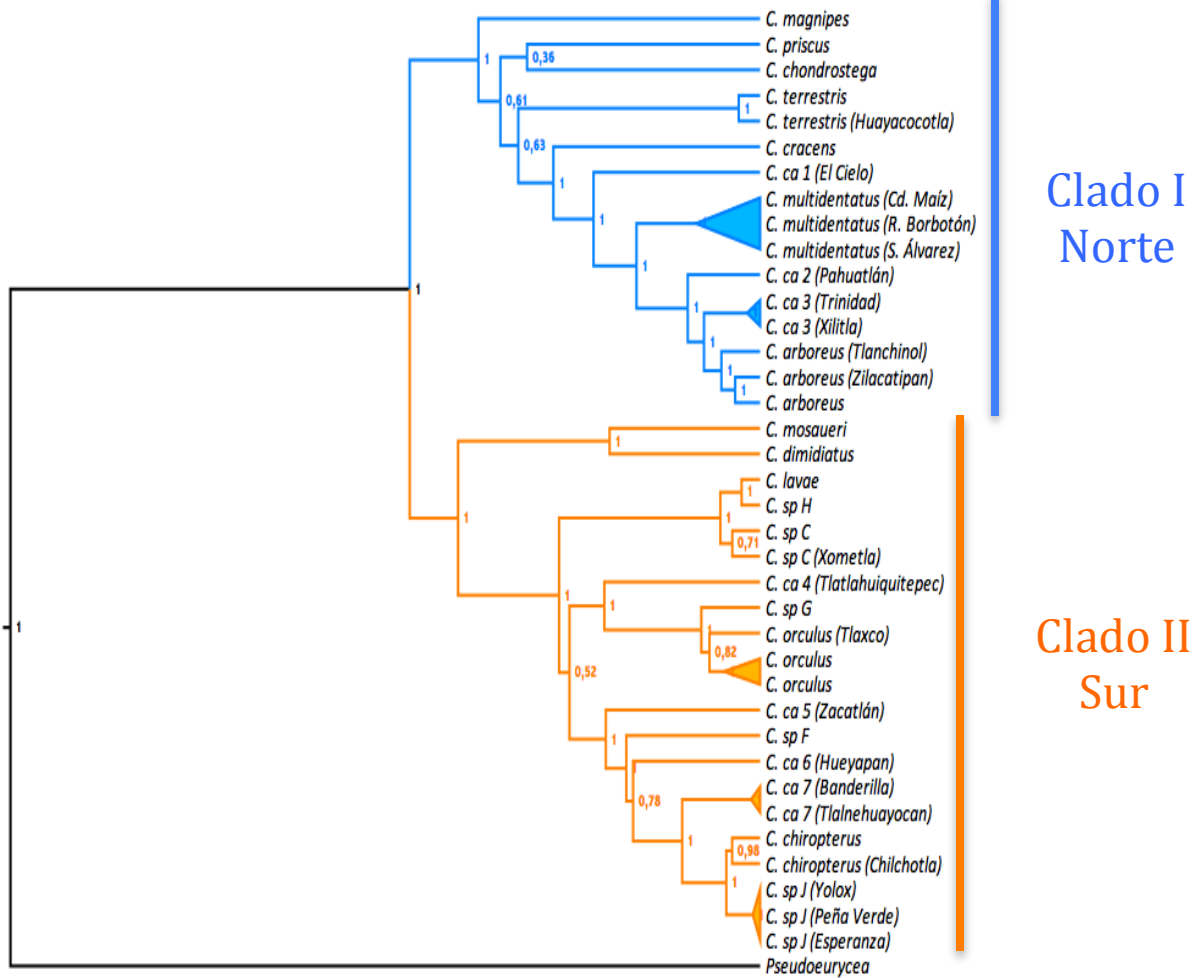


Figura 9. Árbol de especies del género *Chiropterotriton* obtenido a través de *BEAST a partir de DNA mitocondrial (12S, tRNA, 16S) y nuclear (RAG1), con probabilidades posteriores. El árbol está agrupado en dos clados principales; Clado I (azul) que incluye especies distribuidas desde el estado Nuevo León hasta Hidalgo y Clado II (naranja) con una correspondencia geográfica desde el estado de Hidalgo a Oaxaca.

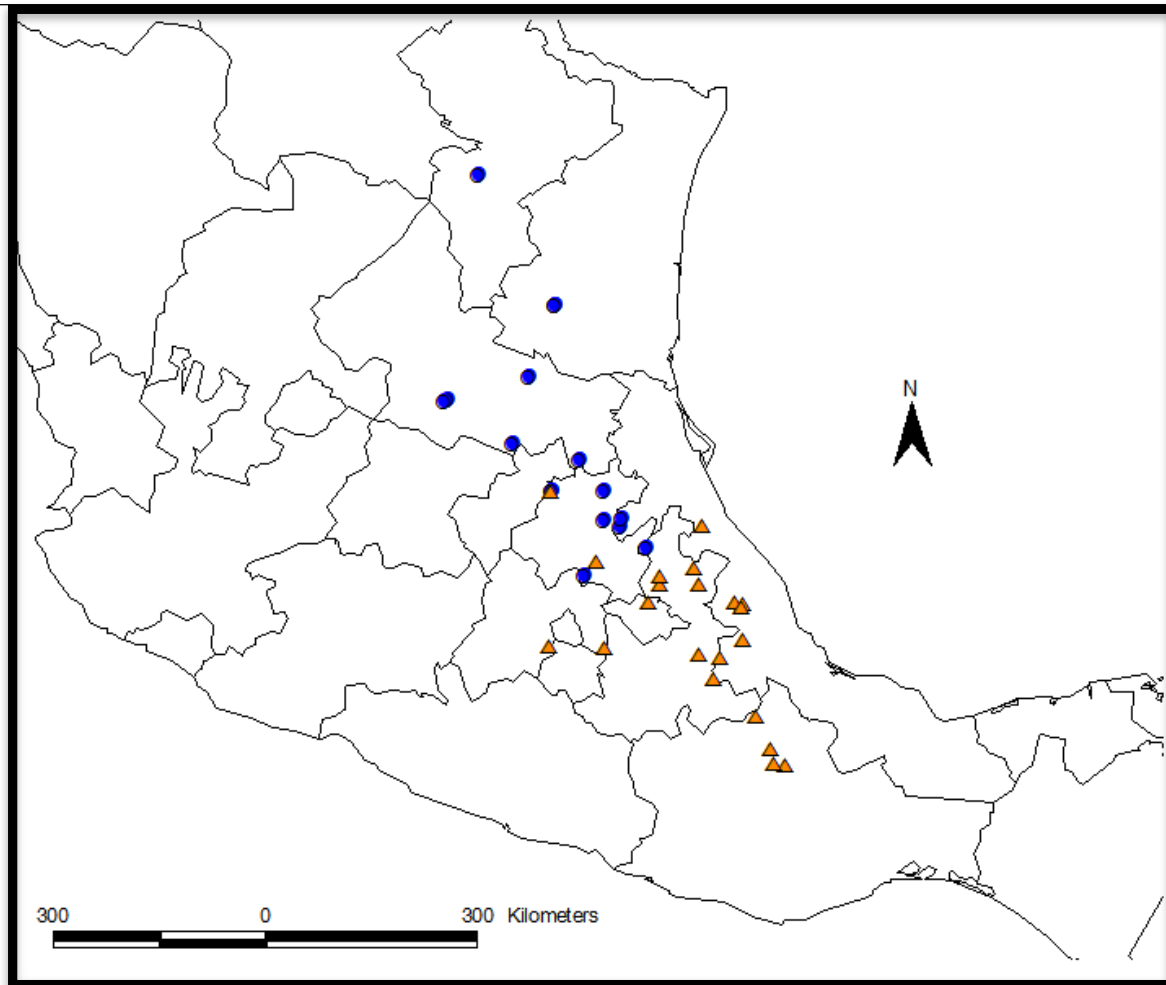


Figura 10. Referencia geográfica del clado I (círculos azules) y clado II (triángulos naranjas).

Tabla 7. Especies propuestas para el género *Chiropterotriton*.

Especies	Estatus	Localidad	Estado
<i>C. arboreus</i>	Descrita	Zacuatlipán	Hidalgo
<i>C. arboreus</i>		Tlanchinol	Hidalgo
<i>C. arboreus</i>		Zilacatipan	Veracruz
<i>C. chiropterus</i>	Descrita	Huatusco	Veracruz
<i>C. chiropterus</i>		Chilchotla	Oaxaca
<i>C. cracens</i>	Descrita	El cielo	Tamaulipas
<i>C. chondrostega</i>	Descrita	Parque Nacional Los Mármoles	Hidalgo
<i>C. dimidiatus</i>	Descrita	Mineral del Chico	Hidalgo
<i>C. lavae</i>	Descrita	La Joya	Veracruz
<i>C. magnipes</i>	Descrita	Parque Nacional Los Mármoles	Hidalgo
<i>C. mosaueri</i>	Descrita	Parque Nacional Los Mármoles	Hidalgo

<i>C. multidentatus</i>	Descrita	Cd. del Maíz, Rancho Borbotón, Sierra de Álvarez	San Luis Potosí
<i>C. orculus</i>	Descrita	Llano Grande, Parque Nacional Izta-Popo, Lagunas de Zempoala	Edo. de México, Distrito Federal, Hidalgo
<i>C. orculus</i>		Tlaxco	Tlaxcala
<i>C. priscus</i>	Descrita	Cerro Potosí	Nuevo León
<i>C. terrestris</i>	Descrita	Zacualtipán, Tianguistengo	Hidalgo
<i>C. terrestris</i>		Huayacocotla	Veracruz
<i>C. sp C</i>	Sin describir	Puerto Aire	Veracruz
<i>C. sp C</i>		Xometla	Veracruz
<i>C. sp F</i>	Sin describir	Xicotepec de Juárez, Cuetzalan	Puebla
<i>C. sp G</i>	Sin describir	Chignahuapan	Puebla
<i>C. sp H</i>	Sin describir	Las Vigas	Veracruz
<i>C. sp I*</i>	Sin describir	Texmalaquilla	Puebla
<i>C. sp J</i>	Sin describir	Esperanza	Oaxaca
<i>C. sp 15*</i>	Sin describir	Mineral del Chico	Hidalgo
<i>C. ca 1</i>	Candidata	El Cielo	Tamaulipas
<i>C. ca 2</i>	Candidata	Pahuatlán	Puebla
<i>C. ca 3</i>	Candidata	Xilitla, Trinidad	San Luis Potosí
<i>C. ca 4</i>	Candidata	Tlatlauquitepec	Puebla
<i>C. ca 5</i>	Candidata	Zacatlán	Puebla
<i>C. ca 6</i>	Candidata	Hueyapan	Puebla
<i>C. ca 7</i>	Candidata	Banderilla, Tlalnehuayocan	Veracruz

* Especies no disponibles para este estudio

VI. DISCUSIÓN

Actualmente continúan proponiéndose especies nuevas de anfibios alrededor del mundo (Canseco-Márquez y Parra-Olea, 2003; García-París *et al.*, 2002; Parra-Olea y Wake, 2001; Parra-Olea *et al.*, 2002; Parra-Olea *et al.*, 2004). Sin duda las herramientas moleculares han sido precursoras de una visión más amplia sobre la biodiversidad de especies en el planeta (Wake, 2009). Particularmente los pleodontidos han diversificado notablemente en el nuevo mundo, hasta la fecha la mayor cantidad de especies se encuentran descritas en los Estados Unidos de América con un total de 145, seguido de México con 114 especies (AmphibiaWeb, 2014).

La relevancia del presente estudio radica en una aportación considerable en el número de especies de pletodontidos en México (de 114 a 125 especies) y es una evidencia clara de las ventajas en la aplicación de herramientas moleculares para un mejor acercamiento a la diversidad de especies en este país. La delimitación de especies a través de filogenias moleculares juega un papel importante en los trabajos actuales sobre diversidad biológica, sobretodo en grupos en los cuales los caracteres morfológicos no son suficientes para su diferenciar entre varios taxones no iguales. Existen desacuerdos por el uso de secuencias de DNA para la propuesta de especies nuevas, sin embargo la aceptación de éstas se ha dado gracias a la ventaja sobre los métodos morfológicos que requieren de una agrupación, lo cual a veces resulta muy problemático (Pons *et al.*, 2006). Adicionalmente, dada la tasa de extinción actual de especies alrededor del mundo es mejor sobreestimar la diversidad biológica que subestimarla (Frost y Hillis, 1990).

El trabajo de Darda (1994) está basado en aloenzimas, es decir que la filogenia propuesta está basada en material genético nuclear, mientras que el trabajo de Parra-Olea (2004) está basado en DNA mitocondrial (16S). El presente estudio combina secuencias mitocondriales y nucleares, además presenta un muestreo con un mayor número de poblaciones. En este caso, los análisis filogenéticos de genes mitocondriales (12S, tRNA, 16S) y los análisis concatenados generaron árboles similares, los cuales están mejor resueltos en comparación con los análisis del fragmento nuclear RAG1. Esto puede deberse a las características del DNA mitocondrial tales como; alta tasa de evolución, ausencia de recombinación y herencia matrilineal (Avise, 2008). El gen RAG1 resultó muy conservado y con pocos caracteres informativos, lo que produjo árboles débilmente apoyados con presencia de politomías (Figuras 5 y 6), sin embargo la combinación de caracteres mitocondriales y nucleares resultó en arboles mejormente resueltos que los generados sólo

con el gen nuclear (Figura 7). De esta manera, los árboles mitocondriales, concatenados y el árbol de especies apoyaron una misma hipótesis porque fueron concordantes en la gran mayoría de los clados (Tabla 6).

En esta hipótesis filogenética no se pudo resolver la posición de las especies basales del grupo, ya que en la base del Clado I siempre existieron discordancias entre los distintos análisis, así como un bajo apoyo de ramas. Las razones de esta discordancia pueden ser el separación incompleta de linajes y el flujo génico entre poblaciones (Fisher-Reid y Wiens, 2011), sin embargo la resolución basal podría obtenerse con el uso de más marcadores tanto mitocondriales como nucleares.

En comparación con los trabajos anteriores, los resultados que aquí se encontraron muestran algunas diferencias. Por ejemplo, en el trabajo de Darda (1994) la posición de *C. terrestris* estaba en el clado sur (Clado II), mientras que *C. dimidiatus* y *C. mosaueri* estaban agrupados en clado norte (Clado I), no obstante, en el presente estudio se observó un agrupamiento similar de *C. terrestris* únicamente en el análisis de inferencia bayesiana con datos concatenados (Fig. 8). Por otro lado, *C. mosaueri* se agrupó en el norte sólo en el análisis de máxima verosimilitud con el fragmento nuclear (Fig. 5). Sin embargo, en la filogenia propuesta por Parra-Olea (2004) ya aparecen tal como se presenta en este trabajo y la mayoría de los árboles presentados en este estudio, así como en el mejor árbol obtenido que fue el árbol de máxima verosimilitud construido con base a los genes mitocondriales (Fig. 3); esto era de esperarse ya que se utilizó la misma región (16S), sin embargo en este estudio hay un mayor número de pares de bases y un mejor apoyo de ramas.

Se propone la existencia de siete especies candidato confirmadas y cuatro inclusiones de poblaciones a ciertas especies putativas, las cuales requieren de una

corroboración morfológica. Con la suma de las siete especies candidato confirmadas aquí propuestas y la corroboración de cuatro especies antes propuestas, el género *Chiropterotriton* contendría al menos 23 especies y dos más considerando las especies *C. sp I* y *C. sp 15* que no fueron incluidas en este estudio. La especie *C. sp H* propuesta en el trabajo de Darda (1994) no tiene un apoyo filogenético en este estudio, por lo que queda a reserva de la revisión morfológica donde se corroboren las características que diferencien estos taxones con respecto a *C. lavae*. Asimismo, este estudio no incluye tres de los ocho taxones que quedaron como especies nuevas en trabajos anteriores (Darda, 1994; Parra-Olea, 2004). La *C. sp I* se distribuye en la localidad de Santa Cruz de Texmalaquilla, Puebla y en este caso no fue posible hacer el muestreo durante la realización de este trabajo. *C. sp 15* se encuentra en El Mineral el Chico, Hidalgo, de esta especie solo había una muestra que no fue posible secuenciar por lo que un nuevo muestreo es necesario. Por último, *C. sp K* estaba registrado en el Cerro San Felipe, Oaxaca, sin embargo esta localidad es incongruente entre informes y registros de su existencia, así como su posición geográfica por lo que quedaría fuera de las especies en este género.

El género *Chiropterotriton* se divide en dos clados principales, el Clado I que ocurre en la Sierra Madre Oriental (SMO) con límite en la Faja Volcánica Transmexicana (FVT) y el Clado II que se distribuye en la FVT y continúa hasta la Sierra de Juárez. Por tanto, la SMO y la FVT juegan un papel importante en los procesos evolutivos de este género (Darda, 1994; Parra-Olea, 2004).

La Sierra Madre Oriental ha sido motivo de estudios de biodiversidad dada su riqueza de especies y la importante cantidad de endemismos que posee, esto viene asociado con el complejo mosaico topográfico, geológico y climático que contiene (Luna *et al.*, 2004). En términos de herpetofauna, la SMO tiene más del 50% de las familias que existen

en México; contiene 207 especies, además de un alto nivel de endemismos. Las salamandras pletodontidas ocupan un lugar importante con 15 especies endémicas, a la Sierra Madre Oriental; las cuales están distribuidas en la parte norte, centro y sur de la sierra, siendo ésta última en donde se registra un mayor número de salamandras endémicas (Canseco-Márquez *et al.*, 2004). La mayoría de las especies del género *Chiropterotrion* ocurren en la SMO y los patrones de distribución de las especies norteñas están asociados a los efectos de las glaciaciones que delimitaron su distribución y su grado de endemismo, las especies centrales son el resultado de eventos vicarianes asociados los periodos interglaciares y ligados a la distribución archipelágica del bosque mesófilo de montaña. La región sureña de la SMO se ha caracterizado por el alto porcentaje de endemismos (Flores-Villela, 1998; Canseco-Márquez *et al.*, 2004). En pletodontidos también es notoria la diversidad y el grado de endemismos en el sur de la SMO, sin embargo, el factor determinante en su distribución parece ser la altitud (Wake, 1987). Se han encontrado patrones de diversificación altitudinal en géneros como *Bolitoglossa*, *Pseudoeurycea* y *Thorius*, donde se explica la hipótesis de una colonización temprana a altitudes intermedias y reciente en altitudes bajas y altas (Wiens *et al.*, 2007). Aunado a esto, los gradientes climáticos y topografía accidentada de estas cadenas montañosas son factores importantes para el aislamiento y divergencia de poblaciones (Rovito *et al.*, 2013).

La Faja Volcánica Transmexicana también ha llamado la atención por la biodiversidad existente en varios grupos (Luna *et al.*, 2007). Esta área se caracteriza por poseer una amplia gama de climas y por ende posee casi todos los tipos de vegetación descritos en México (Rzedowski, 1981), es por ello que se considera la provincia geográfica más heterogénea y compleja en historia geológica y biótica de México. La heterogeneidad de la FVT repercute a su vez en la gran diversidad herpetofaunística, ya que

aquí se encuentra casi la cuarta parte del total de las especies que se distribuyen en México (249), de las cuales el 80% son endémicas del territorio mexicano (Flores-Villela y Canseco-Márquez, 2007). De esta manera, la FVT se ha reconocido por tener uno de los endemismos más elevados de anfibios y reptiles, donde la riqueza y endemismo se encuentra mayormente concentrado hacia el sureste de la misma. Los caudados representan el 17.3% de la herpetofauna presente en la FVT, donde los pleodontidos ocupan aproximadamente el 25% de las especies registradas para México y son la segunda familia de salamandras que posee más especies endémicas en esta zona, después de la familia Ambystomatidae (Flores-Villela y Canseco-Márquez, 2007). El patrón de distribución del género *Chiropterotriton*, está relacionado con la altitud y tipos de vegetación, tal como ha sido asociado en los pleodontidos que existen en la FVT (Wake y Lynch, 1976; Wake 1987; Flores Villela 1998). La heterogeneidad de ésta región ha influenciado la especiación relativamente reciente de este género; la mayoría de especies que se han propuesto con herramientas moleculares ocurren en esta área (*C. sp H*, *C sp C*, *C. sp G*, *C. sp F*, *C. ca 4*, *C. ca 5*, *C. ca 6*, *C. ca 7*), esto debe estar asociado a que morfológicamente son muy similares y su aislamiento es relativamente reciente.

El género *Chiropterotriton* es endémico a México y según la Lista Roja de la IUCN y la NOM 059 la mayoría de las especies descritas están amenazadas: Ello está asociado principalmente a la actividad antropogénica, el cambio climático y la incidencia del patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* (Rovito *et al.*, 2009). La situación de las especies aún no descritas es desconocida por lo que es importante continuar con estudios de estas poblaciones que probablemente se encuentren en el mismo estatus que las conocidas hasta ahora, ya que este tipo de organismos presentan un alto grado de vulnerabilidad ecológica (García-Vázquez *et al.*, 2006). La SMO y la FVT son reconocidos por su riqueza

de especies de salamandras y alto grado de endemismos, por lo que los planes de conservación deben incluir los sitios con alta concentración de especies endémicas principalmente aquellas que presentan una distribución muy restringida, debido a que la pérdida de éstas áreas puede provocar la extinción de muchos linajes (Thirgood y Heath, 1994). Si se pierde información sobre estas especies microendémicas se pierde también el conocimiento y entendimiento de la diversidad de bolitoglossinos en México, los cuales representan el 31% de la fauna de anfibios en México y que por amenazas globales están siendo erradicados rápidamente de sus lugares de distribución. Estudios biogeográficos de este género pueden contribuir con información valiosa para la toma de decisiones sobre aspectos de conservación, principalmente por la ocurrencia de áreas de endemismos y el reconocimiento asociado de “hotspots” (Morrone y Crisci, 1992).

VII. CONCLUSIONES

- La filogenia molecular del género *Chiropterotriton* propuesta en este estudio posee una estructura geográfica, es decir que existe un patrón en la distribución de los taxones con respecto a su posición filogenética.
- Se proponen siete especies candidatas confirmadas, las cuales aumentarían considerablemente el número de especies para este género
- En este trabajo se apoyan las especies *C. sp C*, *C sp F*, *C sp G* y *C. sp J*, que fueron propuestas en trabajos anteriores.
- La Faja Volcánica Transmexicana y Sierra Madre Oriental juegan un papel importante en la especiación de *Chiropterotriton*, ya que en ellas se distribuyen la mayoría de las especies de este género.
- El seguimiento de este trabajo y la descripción de las especies nuevas son necesarias para el conocimiento de la biodiversidad de anfibios en México, así como su conservación.

CATALOGO DE ESPECIES DEL GÉNERO *Chiropterotriton*

Este catálogo está basado en la información de “Les Urodèles du monde” realizada por Jean Raffaëlli (2007), que se encuentra publicada en Amphibiaweb.

Chiropterotriton arboreus

(Taylor, 1941)



Descripción: Longitud hocico-cloaca (LHC) de hasta 3,7 cm (9,4 cm con cola). Tronco corto y cola muy alargada, miembros bien desarrollados, dedos de manos y pie fuertemente palmeados, truncados a su extremidad, cabeza aplanada dorsalmente, glándula ancha en el macho, hocico redondeado, ventana nasal pequeña, difiere de *C. multidentatus* por una cabeza más aplanada, sus extremidades son más grandes y más palmeados. Las hembras, que tienen en general una cabeza más estrecha y más corta que los machos, son habitualmente azul grises a negruzcos en el dorso, negruzcos en el vientre con una mancha clara sobre la garganta y el hocico, a veces con manchas rojas sobre el fémur o para la base de la cola. Los machos son grisáceos con una mancha negra y muy fina sobre las partes dorsales, con un pigmento rojizo para la base de la cola. A veces una banda dorsal roja anaranjada en los machos.

Hábitat: Arborícola, en el bromelias de bosques mixtos pino/encino y bosques nublados.

Distribución: El este de Hidalgo, en la región de Tianguistengo (simpatria con *C. terrestris*) entre 1 900 y 2 100 msnm.

Chiropterotriton chiropterus

(Cope, 1863)



Descripción: La población original y las consideradas parte del complejo *chiropterus* varían sobre todo por el grado de extensión del palma de los dedos y los dedos del pie. Colectivamente el complejo posee: pequeña talla, dedos y dedos del pie parcialmente palmeados. Cola más larga que el resto del cuerpo. La coloración suele ser de gris a negra azulada sobre las partes dorsales y laterales, también puede ser color crema con los costados negruzcos. A veces el pigmento crema forma dos fajas dorso laterales, encerrado por una banda dorsal rojiza. Estas diferencias de coloración, citadas por Taylor (1938), son más o menos sensibles según las poblaciones y las especies. La distribución de la especie está restringida en base a el trabajo de Parra-Olea (2004) a la localidad tipo reportada por Cope (1863), la cual fue precisada posteriormente por Langman (1949).

Hábitat: Bromelias

Distribución: Bosque tropical de tierras bajas en la localidad de Huatusco, Veracruz

Chiropterotriton chondrostega

(Taylor, 1941)



Descripción: longitud HC de 2,9 cm. Cola larga. Generalmente coloración oscura uniforme, muy pocos ejemplares conocidos.

Hábitat: Bosques mixtos de pinos/encino con rango de 2000 a 2 300 msnm. Terrestre.

Distribución: Durango, noroeste de Hidalgo. Posiblemente también en el este de Querétaro.

Chiropterotriton cracens

(Rabb, 1958)



Descripción: Longitud HC de 3,1 cm. Cuerpo fino, cola larga, más larga que en caso de *C. chondrostega*, alcanzando 1,5 veces que el resto del animal, y miembros más alargados. Coloración parda uniforme dorsalmente, costados ligeramente más sombríos, pero no hacen contraste. Mancha blanca sobre el vientre, consagrándosele un aspecto blanquecino. Hembras más grandes, hocico más redondeado, cola, miembros y cabeza más cortos que los machos.

Hábitat: Se les encuentra en Bromelias en bosque nublado, así como en tierra en bosques húmedos de pino/encino.

Distribución: al oeste de Gómez Farías, sudoeste de Tamaulipas, noreste de México, entre 1500 y 2 000 msnm.

Chiropterotriton dimidiatus

(Taylor, 1940)



Descripción: longitud HC de 2,7 cm. Especie muy pequeña con mucho dimorfismo sexual. Cabeza estrecha, en el prolongamiento del cuerpo, la ventana nasal alta, el hocico truncado en el macho, redondeado en la hembra, protuberancia nasolabial en el macho. Miembros cortos, más largos en el macho, los dedos y los dedos del pie pequeños y fuertemente palmeados. Coloración dorsal parda, sobre todo en la hembra, a veces una banda dorsal más clara, y a menudo dos fajas dorsolaterales color morado oscuro. La banda dorsal es a menudo recubierta con un dibujo en forma de espigas. A menudo una mancha occipital anaranjada y una parte de los miembros superiores anaranjadas.

Hábitat: Bosques mixtos húmedos de pino/roble y abetos, se encuentran bajo las cortezas de troncos y de pedazos vegetales.

Distribución: entre 2 500 y 2 700 msnm, en el Parque Nacional El Chico, al sur de Hidalgo.

Chiropterotriton lavae

(Taylor, 1942)



Descripción: Longitud HC de 3,5 cm. Pequeña talla. Aspecto fino y esbelto, ojo prominente, hocico truncado y premaxilar que perfora el labio en el macho, la cabeza más ancha que el cuerpo, los miembros largos, palma moderada, dedos y dedos del pie muy ensanchados, a las extremidades redondeadas, coloración dorsal variable, de pardo a negruzco uniforme, o con una banda dorsal crema que se prolonga sobre la cola, la banda que es bordeada por una región dorsolateral sombría, o a veces dos fajas dorsolaterales que encierran una zona central clara cubierta de reticulaciones y de pequeña manchas negras. Región de la nuca clara, dos pequeñas fajas claras para la base de la cola. Partes ventrales claras.

Hábitat: Bromelias en bosque mixto de pino/encino.

Distribución: cerca de Joya, Veracruz, a 2100 msnm.

Chiropterotriton magnipes

(Rabb, 1965)



Descripción: Longitud HC de 6 cm. Cola más corta que el resto del cuerpo. Macho más pequeño y cola del macho más larga que la hembra. Miembros alargados, dedos y dedos del pie anchos y fuertemente palmeados. Cabeza aplanada y ancha, ojo grande y muy prominente. Oscuro uniforme, manos, pies y partes ventrales más claras.

Hábitat: Cuevas con estalagmitas (con presencia de una fauna importante de artrópodos cavernícolas) y grietas rocosas bajo bosques mixtos pinos/encino.

Distribución: en el sudeste de San Luis Potosí y el noroeste de Querétaro, entre 1 170 y 1 810 msnm.

Chiropterotriton mosaueri

(Woodall, 1941)



Descripción: Tiene cuerpo de tamaño medio, de 39,6 mm a 46,4 mm LHC. La cola es delgada y larga que el cuerpo (46,5 a 63,9 mm de longitud de la cola, la cola: relación entre el cuerpo de 1,35). Hocico es truncado, con la mandíbula superior sobresale más allá de la menor. nariz grande, ubicado cerca de los ángulos de la boca. Las extremidades son muy largas, con dedos superpuestos una distancia de 2 pliegues costales cuando adpreso. Dedos de los pies son espatuladas y son palmeadas. Esta especie tiene 12 ó 13 surcos costales. Dientes vomerianos están presentes en dos series de arcos de 8 a 13 dientes en cada serie. Los machos tienen dientes posteriores maxilares, como *C. multidentatus*.

Hábitat: Cavernícolas (Woodall 1941), simpátricas con *Chiropterotriton magnipes*.

Distribución: Es endémica del noreste de México, en la Sierra Madre Oriental. La localidad tipo es de un bosque mixto de pino/encino, cerca de Durango y el noroeste de Hidalgo, en una pendiente rocosa a 2160 msnm.

Chiropterotriton multidentatus

(Taylor, 1939)



Descripción: Longitud HC de 3,8 cm. Miembros grandes, palmas reducidas, cabeza relativamente grande, ancha y aplastada. Hocico fuertemente truncado, particularmente en el macho. Glándula indistinta del macho. Según Rabb (1958), los individuos del Tamaulipas son más pequeños, tienen una cola más larga, una cabeza más aplanada, dedos de mano y dedos del pie más cortos y una coloración más variable que los de Hidalgo.

Hábitat: Bosques mixtos húmedos pinos/encino, en bromelias y en las grietas del suelo, bajo los pedazos vegetales y en los troncos, entre 1 100 y 1 800 msnm.

Distribución: sur de Tamaulipas y del extremo sureste de San Luis Potosí.

Chiropterotriton orculus

(Cope, 1865)



Descripción: No hay una descripción concisa para esta especie ya que al parecer puede tratarse de un complejo de especies. La descripción original de Cope (1865) refiere a esta especie como *Spelerpes orculus*, la forma del cuerpo está referida muy similar a *C. chiropterus* pero más grueso, además la cabeza y cuello son más largos y grandes. Su coloración es negra uniforme. Presenta once pliegues costales, hocico redondeado, truncado labio redondeado y ojos poco prominentes. La cola comprimida y plana por encima. Los dígitos son cortos y aplanados, y no son palmeadas. Tiene una serie de dientes vomerianos muy oblicuos. Según Darda (1994) *C. orculus* está descrito en sinonimia con *C. chiropterus* y en su estudio filogenético las considera como las poblaciones A y B del complejo *C. chiropterus*.

Distribución: Distrito Federal y Estado de México; Desierto de los Leones, Llano Grande y Río Frío.

Chiropterotriton priscus

(Rabb, 1956)



Descripción: Longitud HC de 5 cm. Miembros bastante cortos, dedos y dedos del pie cortos y ligeramente palmeados para su base. Cola más bien corta para el género, sobrepasando apenas el resto del cuerpo. Pardo mixto de verde difuso sobre los lados superiores con pequeños puntos blancos de manera irregular repartidos, líneas laterales más claras volviéndose parduzcos al enfoque de las partes ventrales, que son blanco sucio a marrón claro. Las poblaciones del sur del área tienen el vientre claro y proporciones diferentes. Gándula del macho es prominente casi circular. Joven más sombrío que el adulto.

Hábitat: Bosques de pinos y mixtos pinos/abetos alrededor de 3000msnm. Terrestre, bajo cortezas, cepas, troncos y hojas de agaves. A veces en simpátrica con *P. galeanae* (Burkhardt, 2005).

Distribución: En el norte (Nuevo León) y en el sur (Tamaulipas). Varias zonas alrededor de Cerro Potosí, Nuevo León, y más en el sur sobre Cerro Pena Nevada (Tamaulipas, en la frontera de Nuevo León).

Chiropterotriton terrestris

(Taylor, 1941)



Descripción: 6,6 cm (longitud total). Integrado geográficamente en el grupo Norte y antiguamente considerado como una subespecie de *C. chondrostega*, pero más próximo genéticamente del grupo Meridional (Darda, 1994). Pardo con o sin banda dorsal rojiza a amarillenta más clara que las partes laterales sombrías.

Hábitat: Terrestre, en las hojas secas, los troncos y las cepas en descomposición.

Distribución: Ciudad de Joya del Cedro, en la reserva de Sierra Gorda (Querétaro), a 1700 m, en los bosques mixtos de pinos y robles. También alrededores de Zacualtipan, en el nordeste de Hidalgo, entre 1 640 y 2 000 m, en bosques mixtos pino/encino muy húmedos y bosques nublados con bromelias, y en Apulco, extremo meridional de Hidalgo.

Especies sin describir

- C. sp. A: distrito federal de México, desierto de los Leones y Llano Grande (Estado de México) en los alrededores de 3 000 m.
- C. sp. B: Rio Frio (parque nacional), está del Estado de México, en los bosques mixtos pinos/encino, a tierra en las hojas secas y bajo los pedazos vegetales, a 3 075 msnm (población 4 de Darda). Esta población sería idéntica a la presenta sobre las pendientes norte del Popocatepetl.
- C. sp. C: Puerto del Aire, a 2 500 m, en el centro occidental de Veracruz (población 5 de Darda).
- C. sp. D: corresponde a la población 6 de Darda, en Las Vigas, sobre las pendientes norte del volcán a Cofre de Perote, a 3000m (centro norte de Veracruz).
- C. sp. F: Xicotepec de Juárez, el norte de Puebla, a 1 150 m (población 19 de Darda).
- C. sp. H: corresponde a la población 21 de Darda, sobre las alturas de Las Vigas, a 3 000 m (centro norte de Veracruz).
- C. sp. I: población 22 de Darda. La Santa Cruz de Texmalaquilla, centro de Puebla, a 2,700m.
- C. sp. J: Esperanza (1 980 m) y Cerro Pelón (2100 m), Oaxaca central, correspondiente a las poblaciones 23 y 24 de Darda.
- C. sp. K: Cerro San Felipe, Oaxaca central, a 2 850 m (población 25 de Darda).

VIII. LITERATURA CITADA

- AmphibiaWeb: Information on amphibian biology and conservation. 2014. Berkeley, California: AmphibiaWeb. Available: <http://amphibiaweb.org/>. (Accessed: Jan, 2014).
- Avise, J. C. 2008. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36: 3–15.
- Bond J y Stockman A. 2008. An Integrative Method for Delimiting Cohesion Species: Finding the Population-Species Interface in a Group of Californian Trapdoor Spiders with Extreme Genetic Divergence and Geographic Structuring. *Society of Systematic Biologists*. 57(4): 628-646.
- Canseco-Márquez L. y Parra-Olea G. 2003. A new species of *Pseudoeurycea* (Caudata: Plethodontidae) from northern Oaxaca, Mexico. *The Herpetological Journal*. 13:21-26.
- Canseco-Márquez L, Mendoza-Quijano F y Gutiérrez-Mayén M. 2004. Análisis de la distribución de la herpetofauna. En: Luna I, Morrone J y Espinosa D (eds). *Biodiversidad de la Sierra Madre Oriental*. Las Prensas de Ciencias, México, DF. 417-437 pp.
- Chen F y Li W. 2001. Genomic divergences between humans and other hominoids and the effective population size of the common ancestor of humans and chimpanzees. *The American Journal of Human Genetics*. 68: 444–456.
- Chippindale P, Bonett T, Baldwin A y Wiens J. 2004. Phylogenetic evidence for a major reversal of life history evolution in plethodontid salamanders. *Evolution* 58: 2809–2822.
- CONABIO (comp.). 2009. Catálogo de autoridades taxonómicas de los reptiles (Reptilia: Chordata) de México. Base de datos SNIB-CONABIO. México. Incluye información del proyecto CS003.
- Cope, E.D. 1863. On *Trachycephalus*, *Schaphiopus* and other American Batrachia. *Proceedings of the Academy of Natural Science of Philadelphia*. 15: 43-54.
- Cope, E.D. 1865. Third contribution to the herpetology of tropical America. *Proceedings of the Academy of Natural Science of Philadelphia* 17: 185-198.
- Corl, A y Ellegren, H. 2013. Sampling strategies for species trees: the effects on phylogenetic inference of the number of genes, number of individuals, and whether loci are mitochondrial, sex-linked, or autosomal. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 67(2):358-66

- Darda, D. M. 1994. Allozyme variation and morphological evolution among Mexican salamanders of the genus *Chiropterotriton* (Caudata: Plethodontidae). *Herpetologica*, 50: 164-187.
- Drummond A y Rambaut A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214.
- de Queiroz, K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology* 56(6):879-886.
- Edwards S, Liu L y Pearl D. 2007. High-resolution species trees without concatenation. *PNAS*. No. 14 vol. 104: 5936-5941.
- Edwards, S. 2009. Is a new and general theory of molecular systematics emerging? *The Society for the Study of Evolution. Evolution* 63-1: 1–19
- Fisher-Reid C y Wiens J. 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.
- Flores-Villela, O. y Gerez, P. 1994. Biodiversidad y conservación en México: vertebrados, vegetación y uso del suelo. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Universidad Nacional Autónoma de México, México. 439 pp
- Flores-Villela, O. 1998. Herpetofauna de México: distribución y endemismo. *En: Ramamorthy, Bye, Lot y Fa (Eds.) Diversidad Biológica de México: orígenes y distribución. Instituto de Biología, UNAM. Pp. 251-278.*
- Flores-Villela O y Canseco-Márquez L. 2004. Nuevas especies y cambios taxonómicos para la herpetofauna de México. *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)*. 20, 002: 115-144.
- Flores-Villela O y Canseco-Márquez L. 2007. Riqueza de la herpetofauna. *En: Luna I, Morrone J y Espinosa D (eds). Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana. UNAM. México. 514 pp.*
- Frost D y Hillis D. 1990. Species in concept and practice: Herpetological applications. *Herpetologica* 46:87-104.
- Gadagkar SR, Rosenberg MS, Kumar S. 2005. Inferring species phylogenies from multiple genes: concatenated sequence tree versus consensus gene tree. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*. 15;304(1):64-74.

- García-Paris M, Parra-Olea G, Brame AH y Wake DB. 2002. Systematic revision of the *Bolitoglossa mexicana* species group (Amphibia: Plethodontidae) with description of a new species from México. *Revista Española de Herpetología*. 16:43-71.
- García-Vázquez U, Canseco-Márquez L, Aguilar-López J, Hernández-Jiménez C, Maceda-Cruz J, Gutiérrez-Mayén M y Melgarejo-Velez E. 2006. Análisis de la distribución de la herpetofauna en la región Mixteca de Puebla, México. *Publicaciones de la Sociedad Herpetológica Mexicana* 3:153-169.
- Highton, R. 1989. Biochemical evolution in the slimy salamanders of the *Plethodon glutinosus* complex in the Eastern United States. Part 1. Geographic protein variation. Illinois. *Biological Monographs* 57: 1-78.
- Highton R y Peabody RB. 2000. Geographic protein variation and speciation in salamanders of the *Plethodon jordani* and *Plethodon glutinosus* complexes in the southern Appalachian Mountains with the description of four new species. In: Bruce RC, Jaeger RG, Houck LD, eds. *The biology of plethodontid salamanders*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 31–94.
- IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 30 September 2011.
- Jockusch E, Kay P, Yanev and David B. Wake. 2001. Molecular Phylogenetic Analysis of Slender Salamanders, Genus *Batrachoseps* (Amphibia: Plethodontidae), from Central Coastal California with Descriptions of Four New Species. *Herpetological Monographs*, Vol. 15, (2001), pp. 54-99
- Jockusch E, Martínez-Solano I, Hansen R y Wake D. 2012. Morphological and molecular diversification of slender salamanders (Caudata: Plethodontidae: *Batrachoseps*) in the southern Sierra Nevada of California with descriptions of two new species. *Zootaxa* 3190: 1-30.
- Kozak KH, Larson A, Bonett RM, Harmon LJ. 2005. Phylogenetic analysis of ecomorphological divergence, community structure, and diversification rates in dusky salamanders (Plethodontidae: *Desmognathus*). *Evolution* 59: 2000–2016.
- Kubatko, L y Degnan, J. 2007. Inconsistency of Phylogenetic Estimates from Concatenated Data under Coalescence. *Syst. Bid.* 56(1):17-24,2007

- Langman I. 1949. Dos figuras casi olvidadas en la historia de la botánica Mexicana. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* 10: 329–336.
- Luna I, Morrone J y Espinosa D. 2004. Biodiversidad de la Sierra Madre Oriental. UNAM. México. 527 pp.
- Luna I, Morrone J y Espinosa D. 2007. Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana. UNAM. México. 514 pp.
- Maddison, W y Knowles, L 2006. Inferring phylogeny despite incomplete lineage sorting. *Systematic Biology*. 55:21-30.
- Maddison, W y Maddison D. 2009. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75
- Morrone J y Crisci J. 1992. Aplicación de métodos filogenéticos y panbiogeográficos en la conservación de la diversidad biológica. *Evolucion Biológica* 6: 53-66.
- Myers N, Mittermeier R, Mittermeier C, da Fonseca G y Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 403: 853-858.
- Nylander JAA. 2004. MrModeltest Version 2. Program distributed by the author. Uppsala University, Sweden: Evolutionary Biology Centre.
- Padial J, Miralles A, De la Riva I, and Vences M. 2010. *The integrative future of taxonomy*. *Frontiers in Zoology* 7:16.
- Padial, J, Chaparro J, Castroviejo-Fisher S, Guayasamin J, Lehr E, Delgado A, Vaira M, Teixeira M, Aguayo R y De la Riva I. 2012. *A revision of species diversity in the Neotropical genus Oreobates (Anura: Strabomantidae), with the description of three new species from the Amazonian slopes of the Andes*. *American Museum Novitates*, 3752: 1–55.
- Parra-Olea G, Papenfuss T y Wake D. 2001. New Species of Lungless Salamanders of the Genus *Pseudoeurycea* (Amphibia: Caudata: Plethodontidae) from Veracruz, Mexico. *Scientific Papers. Natural History Museum. The University of Kansas*. 20, 129: 1-9.
- Parra-Olea G y Wake DB. 2001. Extreme morphological and ecological homoplasy in tropical salamanders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:7888-7891
- Parra-Olea G, García-Paris M y Wake DB. 2002. Phylogenetic Relationships among the Salamanders of the *Bolitoglossa macrinii* Species Group (Amphibia: Plethodontidae),

- with description of two new species from Oaxaca, México. *Journal of Herpetology* 36:356-366.
- Parra-Olea G. 2004. Phylogenetic relationships of the genus *Chiropterotriton* (Caudata: Plethodontidae) based on 16S ribosomal mtDNA. *Canadian Journal of Zoology* 81: 2048-2060.
 - Parra-Olea G, Canseco-Márquez L y García-Paris M. 2004. A morphologically distinct new species of *Pseudoeurycea* (Caudata:Plethodontidae) from the Sierra Madre Oriental of Puebla, México. *Herpetologica*, 64:78-84.
 - Parra-Olea G, García-Paris M y Wake D. 2004a. Molecular diversification of the genus *Bolitoglossa* and its evolutionary and biogeographic consequences for the invasión of American tropics. *Biological Journal of the Linnean Society* 81: 325-346.
 - Pons J, Barraclough T, Gomez-Zurita J, Cardoso A, Duran D, Hazell S, Kamoun S, Sumlin W y Vogler A. 2006. Sequence-Based Species Delimitation for the DNA Taxonomy of Undescribed Insects. *Systematic Biology* 55 (4): 595-609.
 - Rabb. G.B. 1956. A new Plethodontid salamander from Nuevo León, México. *Fieldiana Zoology* 39: 11-20.
 - Rabb, G.B. 1958. On certain Mexican salamanders of the plethodontid genus *Chiropterotriton*. *Occas Pap Museum of Zoology, University of Michigan*. 587: 1-37.
 - Rabb. G.B. 1965. A new salamander of the genus *Chiropterotriton* (Caudata: Plethodontidae) from Mexico. *Brevoria*. 235: 1-8.
 - Raffaëlli J. 2007. *Les Urodèles du Monde*: Penclen Édition.
 - Rambaut A. 2006. Tree Figure Drawing Tool Figtree. UK: University of Oxford. Versión 1.4. Disponible en :[http:// tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/](http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/)
 - Rambaut A y Drummond AJ. 2007. Tracer v1.5. Disponible en: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
 - Robert, E. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acid Research* 32(5), 1792-97.
 - Rokas A, Williams BL, King N y Carroll SB. 2003. Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature* 425:798-804.
 - Ronquist F y Huelsenbeck J P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.

- Rovito S, Parra-Olea G, Vásquez-Almazán C, Papenfuss T y Wake D. 2009. Dramatic declines in neotropical salamander populations are an important part of the global amphibian crisis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105:3231-3236.
- Rovito S, Parra-Olea G, Hanken J, Bonett R y Wake D. 2013. Adaptive radiation in miniature: the minute salamanders of the Mexican highlands (Amphibia: Plethodontidae: Thorius). *Biological Journal of the Linnean Society*. 109 (3): 622–643
- Rzedowski, 1981. *Vegetación de México*. Limusa. México. 432 p.
- San Mauro D, Gower DJ, Oommen OV, Wilkinson M, Zardoya R. 2004. *Phylogeny of caecilian amphibians (Gymnophiona) based on complete mitochondrial genomes and nuclear RAG1*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33: 413–427.
- Sequencher® version 5.0 sequence analysis software, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA <http://www.genecodes.com>
- Stamatakis, 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihoodbased phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688–2690.
- Swofford, D. 2002. PAUP*.Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), 4.0 edn, Sinauer, Sunderland. MA.
- Taylor, E.H. 1939 “1938”. Concerning Mexican salamanders. *Kansas University Science Bulletin* 25: 259-313, pl. 24-29.
- Taylor, E.H. 1940. New salamanders from México, with a discussion of certain know forms. *Kansas University Science Bulletin* 26: 407-439.
- Taylor, E.H. 1941. New plethodont salamanders from México. *Herpetologica*, 2: 57-65.
- Taylor, E.H. 1942. New Caudata and Salientia from Mexico. *Kansas University Science Bulletin* 28: 295-323.
- Thirgood TS y Heath M. 1994. Global patens of endemism and the conservation of Biodiversity. En: Forey P, Humphries C, Vane-Wright (eds). *Systematic and Conservation Evaluation*. Systematics Association Special. Vol. 50: 207-227.
- Vieites D, Min M, Wake DB. 2007. Rapid diversification and dispersal during periods of global warming by plethodontid salamanders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 19903–19907.
- Vieites D, Wollenberg K, Andreone F, Köhler J, Glaw F y Vences M. 2009. *Vast underestimation of Madagascar’s biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

- America 106: 8267–8272.
- Vieites D, Nieto S, Wake M y Wake D. 2011. *A multigenic perspective on phylogenetic relationships in the largest family of salamanders, the Plethodontidae*. Molecular Phylogenetics and Evolution 59: 623–635
 - Wake, D.B. 1966. Comparative osteology and evolution of the lungless salamanders, family Plethodontidae. *Memoirs of the South California Academy of Sciences*. 4: 1-111.
 - Wake. D.B. 1987. Adaptative radiation of salamanders in Middle American cloud forest. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 74: 242-264.
 - Wake, D.B. 2009. What Salamanders have Taught Us about Evolution. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40: 333–52
 - Wake, D. B. y Lynch, J. F. 1976. The distribution, ecology and evolutionary history of plethodontid salamanders in tropical America. *Bulletin of the Natural History Museum of Los Angeles County*, 25: 1-65.
 - Wake D, Roth, G y Wake, M. 1983. On the problem of stasis in organismal evolution. *Journal of Theoretical Biology* 101: 211–224.
 - Weisrock D y Larson A. 2006. Testing hypotheses of speciation in the *Plethodon jordani* species complex with allozymes and mitochondrial DNA sequences. *Biological Journal of the Linnean Society*. 89: 25–51.
 - Wiens J y Penkrot T. 2002. Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (*Sceloporus*). *Systematic Biology* 51:69-91.
 - Wiens J, Parra-Olea G, García-Paris M y Wake D. 2007. *Phylogenetic history underlies elevational biodiversity patterns in tropical salamanders*. *Proceedings of The Royal Society B*. 274: 919-928.
 - Woodall, H.T. 1941. A new Mexican salamander of the genus *Oedipus*. *Pap Museum of Zoology, University of Michigan*. 444: 1-4.
 - Zhang P, Papenfuss T, Wake M, Qu L y Wake D. (2008). Phylogeny and biogeography of the family Salamandridae (Amphibia: Caudata) inferred from complete mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49 : 586–597.

XI. ANEXO

Tabla de distancias genéticas Kimura2-parametros (Parte 1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 <i>C. magnipes</i>	-													
2 <i>C. chondrostega</i>	0.108	-												
3 <i>C. cracens</i>	0.108	0.091	-											
4 <i>Huayacocotla</i>	0.109	0.099	0.087	-										
5 <i>C. terrestris</i>	0.105	0.093	0.084	0.013	-									
6 <i>El Cielo</i>	0.111	0.104	0.077	0.091	0.088	-								
7 <i>C. multidentatus</i>	0.102	0.101	0.080	0.092	0.089	0.071	-							
8 <i>C. multidentatus</i>	0.112	0.105	0.089	0.097	0.097	0.075	0.028	-						
9 <i>C. multidentatus</i>	0.113	0.104	0.085	0.099	0.096	0.073	0.034	0.019	-					
10 <i>Pahuatlán</i>	0.120	0.114	0.096	0.101	0.098	0.085	0.071	0.077	0.069	-				
11 <i>Trinidad</i>	0.108	0.105	0.088	0.092	0.089	0.073	0.051	0.056	0.053	0.042	-			
12 <i>Xilitla</i>	0.112	0.109	0.093	0.091	0.094	0.077	0.055	0.053	0.056	0.047	0.007	-		
13 <i>Tlanchinol</i>	0.108	0.104	0.083	0.098	0.092	0.078	0.057	0.064	0.060	0.048	0.025	0.029	-	
14 <i>C. arboreus</i>	0.107	0.103	0.088	0.092	0.089	0.079	0.055	0.059	0.054	0.041	0.023	0.029	0.019	-
15 <i>Zilacatipan</i>	0.111	0.105	0.091	0.093	0.092	0.083	0.058	0.060	0.058	0.045	0.028	0.028	0.026	0.016
16 <i>C. priscus</i>	0.098	0.093	0.093	0.092	0.087	0.102	0.101	0.109	0.103	0.109	0.097	0.101	0.102	0.101
17 <i>C. dimidiatus</i>	0.132	0.120	0.111	0.111	0.107	0.119	0.119	0.129	0.128	0.112	0.114	0.118	0.109	0.112
18 <i>C. mosaueri</i>	0.122	0.126	0.116	0.110	0.107	0.121	0.114	0.122	0.128	0.127	0.112	0.114	0.116	0.114
19 <i>C. sp H</i>	0.114	0.114	0.102	0.100	0.095	0.113	0.106	0.118	0.120	0.104	0.111	0.115	0.107	0.108
20 <i>C. lavae</i>	0.114	0.112	0.100	0.099	0.092	0.109	0.102	0.116	0.116	0.104	0.109	0.113	0.103	0.107
21 <i>C. sp C</i>	0.119	0.115	0.103	0.101	0.096	0.111	0.105	0.118	0.121	0.108	0.111	0.115	0.108	0.109
22 <i>Xometla</i>	0.112	0.111	0.096	0.096	0.092	0.108	0.105	0.115	0.116	0.103	0.107	0.111	0.102	0.104
23 <i>Tlatlauquitepec</i>	0.131	0.122	0.122	0.103	0.107	0.132	0.124	0.124	0.130	0.124	0.128	0.125	0.130	0.131
24 <i>C sp G</i>	0.114	0.114	0.108	0.104	0.103	0.119	0.109	0.111	0.116	0.109	0.110	0.110	0.107	0.112
25 <i>Tlaxco</i>	0.117	0.115	0.107	0.104	0.104	0.120	0.115	0.116	0.123	0.112	0.118	0.119	0.117	0.117
26 <i>L. Zempoala</i>	0.124	0.120	0.106	0.109	0.110	0.122	0.117	0.121	0.126	0.115	0.120	0.121	0.119	0.120
27 <i>C. orculus</i>	0.118	0.111	0.106	0.105	0.103	0.113	0.110	0.118	0.121	0.109	0.114	0.117	0.114	0.114
28 <i>Hueyapan</i>	0.135	0.133	0.127	0.119	0.119	0.136	0.130	0.127	0.135	0.122	0.129	0.124	0.124	0.126
29 <i>Zacatlan</i>	0.127	0.118	0.109	0.112	0.109	0.120	0.117	0.120	0.125	0.109	0.112	0.115	0.113	0.115
30 <i>C. sp F</i>	0.134	0.114	0.113	0.111	0.105	0.128	0.125	0.133	0.133	0.116	0.122	0.126	0.122	0.123
31 <i>Banderilla</i>	0.123	0.113	0.105	0.103	0.102	0.120	0.112	0.115	0.121	0.104	0.106	0.110	0.107	0.107
32 <i>Tlalnehuayocan</i>	0.124	0.112	0.104	0.103	0.100	0.120	0.113	0.116	0.121	0.103	0.108	0.111	0.108	0.107
33 <i>C. chiropterus</i>	0.131	0.117	0.110	0.111	0.107	0.125	0.118	0.128	0.130	0.113	0.119	0.122	0.115	0.120
34 <i>Chilchotla</i>	0.131	0.119	0.116	0.110	0.108	0.128	0.120	0.122	0.129	0.116	0.118	0.118	0.115	0.120
35 <i>C. sp J (Yolox)</i>	0.127	0.118	0.112	0.106	0.104	0.124	0.115	0.120	0.125	0.109	0.115	0.119	0.111	0.116
36 <i>C. sp J (P. Verde)</i>	0.129	0.118	0.113	0.108	0.105	0.125	0.116	0.122	0.124	0.109	0.116	0.119	0.111	0.116
37 <i>C. sp J</i>	0.128	0.118	0.113	0.108	0.104	0.124	0.115	0.123	0.126	0.110	0.116	0.119	0.112	0.117

Continuación (Parte 2)

	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
15	-															
16	0.100	-														
17	0.116	0.114	-													
18	0.112	0.113	0.071	-												
19	0.110	0.097	0.094	0.105	-											
20	0.110	0.099	0.091	0.103	0.011	-										
21	0.111	0.102	0.095	0.106	0.025	0.021	-									
22	0.107	0.101	0.089	0.101	0.018	0.013	0.014	-								
23	0.130	0.118	0.105	0.117	0.073	0.073	0.077	0.071	-							
24	0.112	0.104	0.094	0.110	0.070	0.068	0.071	0.066	0.061	-						
25	0.116	0.101	0.092	0.108	0.071	0.068	0.071	0.067	0.065	0.022	-					
26	0.121	0.111	0.097	0.117	0.075	0.071	0.077	0.072	0.073	0.030	0.026	-				
27	0.115	0.104	0.093	0.113	0.068	0.066	0.071	0.066	0.072	0.028	0.025	0.023	-			
28	0.125	0.122	0.118	0.127	0.091	0.092	0.093	0.087	0.091	0.086	0.092	0.089	0.089	-		
29	0.119	0.116	0.103	0.119	0.077	0.077	0.077	0.073	0.078	0.074	0.078	0.079	0.072	0.077	-	
30	0.126	0.117	0.101	0.120	0.072	0.071	0.075	0.069	0.082	0.080	0.080	0.082	0.076	0.075	0.067	-
31	0.110	0.107	0.105	0.115	0.067	0.068	0.068	0.064	0.083	0.078	0.077	0.083	0.075	0.064	0.062	0.059
32	0.111	0.105	0.103	0.115	0.068	0.069	0.067	0.065	0.082	0.077	0.076	0.082	0.076	0.065	0.062	0.058
33	0.123	0.114	0.103	0.120	0.075	0.073	0.071	0.070	0.085	0.080	0.081	0.086	0.080	0.075	0.069	0.061
34	0.119	0.110	0.105	0.113	0.080	0.075	0.074	0.072	0.079	0.076	0.077	0.083	0.080	0.076	0.068	0.065
35	0.119	0.111	0.103	0.117	0.074	0.072	0.068	0.067	0.084	0.077	0.080	0.084	0.078	0.076	0.065	0.060
36	0.120	0.112	0.104	0.119	0.075	0.073	0.070	0.068	0.084	0.078	0.081	0.085	0.080	0.076	0.065	0.061
37	0.119	0.110	0.105	0.119	0.075	0.072	0.067	0.068	0.085	0.079	0.080	0.084	0.079	0.076	0.064	0.061

Continuación (Parte 3)

	31	32	33	34	35	36	37
31	-						
32	0.005	-					
33	0.039	0.040	-				
34	0.040	0.040	0.021	-			
35	0.032	0.033	0.018	0.016	-		
36	0.035	0.035	0.019	0.016	0.001	-	
37	0.035	0.033	0.019	0.015	0.001	0.004	-