

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades
Departamento de Biología



Análisis filogenético y filogeográfico de salamandras (Caudata: Plethodontidae) del subgénero *Magnadigita*, subgrupo *lincolni* en parches aislados de Bosque nuboso y sus implicaciones en patrones de aislamiento

Trabajo de graduación en modalidad Tesis presentado por
Hellen Dahinten Bailey

para optar a grado académico de Licenciada en Biología

Guatemala

2019

Análisis filogenético y filogeográfico de salamandras (Caudata: Plethodontidae) del subgénero *Magnadigita*, subgrupo *lincolni* en parches aislados de Bosque nuboso y sus implicaciones en patrones de aislamiento

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades
Departamento de Biología



**Análisis filogenético y filogeográfico de salamandras (Caudata:
Plethodontidae) del subgénero *Magnadigita*, subgrupo *lincolni*
en parches aislados de Bosque nuboso y sus implicaciones en
patrones de aislamiento**

Trabajo de graduación en modalidad Tesis presentado por
Hellen Dahinten Bailey

para optar a grado académico de Licenciada en Biología

Guatemala

2019

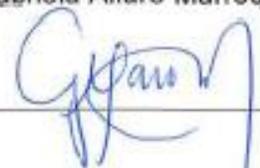
Vo. Bo.


Luis Estuardo Ríos González

Tribunal Examinador


M. Sc. Luis Estuardo Ríos González


Lic. José Miguel Morales Santiago


M. Sc. Gabriela Alfaro Marroquín

Fecha de aprobación: Guatemala, 28 de Noviembre 2019

AGRADECIMIENTOS

Al museo y centro de investigaciones de la Universidad de Texas Arlington (UTA), por todo su apoyo y recomendaciones a lo largo de la investigación. Principalmente a Eric Smith y su familia por la hospitalidad y tiempo en la estadía. A la Colección de Vertebrados de la Universidad del Valle de Guatemala, principalmente a Don Marcelino por su cordial recibimiento a la hora de realizar las mediciones.

A los compañeros del curso de Evaluación Ecológica y Sistemática y Evolución, por el acompañamiento y apoyo para la investigación y que juntos pueda proceder el estudio.

A Marcelo Serrano y su familia por la hospitalidad y disponibilidad para llevar a cabo los estudios dentro de su finca y el interés que le han dedicado a la conservación de esta.

A mis asesores Luis Ríos, por todo su apoyo, interés, tiempo, dedicación y sobre todo soporte emocional a lo largo del desarrollo de la investigación, sin usted no pudo haberse desarrollado este trabajo, gracias por todo este acompañamiento e inspiración. A José Miguel Morales, por todo su conocimiento, tiempo y apoyo compartido a lo largo de esta investigación, gracias por permitirme aprender un poco de todo lo que conoces. También agradezco a Daniel Ariano, por todo su conocimiento dedicado a esta investigación por el acompañamiento a lo largo de los años de carrera y las enseñanzas en el área de Herpetología. A Elena Dardón y Olga Alejandra Zamora, por su apoyo en los análisis genéticos y de desarrollo de las secuencias y filogenias. A Alejandro Vázquez Contreras por su conocimiento sobre estadística y sus recomendaciones de modelos y también por el acompañamiento emocional a lo largo del desarrollo de la tesis. A Diego Incer por su tiempo y apoyo a la hora de realizar los mapas y por brindar varias de las capas para la gestión de las proyecciones.

A mis amigos de la Universidad Alicia, Jairo, Emilio, Javier, Karyn, Katherine, Andrés, Daniel, María Fernanda, Miriam, María Paula, Edgar, Eduardo, Guido, Venado, Karin, China, Adriana, Ericka y Pablo que estuvieron a mi lado y apoyaron a lo largo de este trayecto que no ha sido fácil, también a Gaby, Cristy y María por toda su emoción y confianza colocados en mí. Gracias muchá sin ustedes no hubiera aprendido tanto y sobre todo de experiencias.

También a mi familia, por todo el apoyo a lo largo de esta larga travesía por aguantar de mis enojos y estrés para estos momentos y sobre todo a mi abuelito Javier (Q.E.P.D) por la inspiración a lo largo de mi vida y su apoyo de donde quiera que esté.

Y, por supuesto, a la Universidad del Valle y al Departamento de Biología por todo el conocimiento y espacio para mi desarrollo personal y con todo el cariño agradezco al departamento de las Becas Potencia-T por haber creído en mi desde el inicio.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	iv
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE CUADROS.....	viii
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
A. Clasificación de anfibios.....	3
B. Características generales de Caudata.....	4
C. Distribución de <i>Caudata</i>	5
D. Familia Plethodontidae	5
E. Género <i>Bolitoglossa</i>	8
F. Salamandras de Guatemala	8
G. Sub-grupo <i>lincolni</i>	9
H. Filogeografía y sistemática.....	11
I. Geología y topología de Guatemala.....	12
III. JUSTIFICACIÓN	14
IV. OBJETIVOS	16
A. General.....	16
B. Específicos.....	16
V. HIPÓTESIS	17
VI. METODOLOGÍA	18
A. Sitios de estudio.....	18
1. Recolección de muestras de campo	18
2. Recolección de datos de individuos almacenados.....	18
B. Sujetos de estudio.....	19
1. Individuos colectados	19
2. Muestras almacenadas	19
3. Procesamiento de muestras para análisis de ADN	19

a.	Metodología de extracción de ADN según Jain <i>et al.</i> (2007).....	19
b.	Extracción de ADN con Kit DNeasy (QIAGEN, 2006).....	21
4.	Secuenciación	23
6.	Generación de análisis de componentes principales y análisis de escalado multidimensional no métrico.....	23
7.	Elaboración de árboles filogenéticos.....	24
8.	Construcción de mapas.....	24
VII.	RESULTADOS	25
VIII.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	42
A.	Comparación y revisión taxonómica.....	42
B.	Análisis genético	42
C.	Construcción de dendrogramas.....	43
D.	Medición y evaluación de variables morfológicas.....	43
E.	Generación de árboles filogenéticos	45
F.	Mapas potenciales de distribución	46
G.	Consideraciones finales	46
IX.	CONCLUSIONES	48
X.	RECOMENDACIONES	49
XI.	LITERATURA CITADA.....	50
XII.	ANEXOS	55
a.	Presupuesto	55
b.	Cronograma	58
c.	Script R	59
d.	BLAST.....	61
e.	Árbol filogenético ARN16s.....	66
f.	Árbol filogenético CytB	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de especies de anfibios a nivel mundial	3
Figura 2. Diagrama de dientes de pletodóntidos, señalando mexilares (MT), vomerinos (VT) y premaxilares (PT).....	4
Figura 3. Distribución mundial de Caudata.....	5
Figura 4. Diagrama de lengua de pletodóntidos asemejando proyectil.....	6
Figura 5. Diagrama de extremidades delantera (A) y trasera (B) de pletodóntidos.	6
Figura 6. Diagrama de cabeza de pletodóntido macho con surcos nasolabiales protuberantes. ...	7
Figura 7. Diagrama de salamandra con surcos costales fuertemente pronunciados y localización de cloaca.	7
Figura 8. <i>Bolitoglossa meliana</i>	10
Figura 9. <i>Bolitoglossa lincolni</i>	10
Figura 10. <i>Bolitoglossa franklini</i>	10
Figura 11. Mapa de composición tectónica de Centro América	13
Figura 12. Relaciones evolutivas de taxones según el fragmento ARN16s.....	28
Figura 13. Relaciones evolutivas de taxones según el fragmento CytB	29
Figura 13. Análisis de componentes principales (PCA).....	33
Figura 14. Análisis de escalado multidimensional no métrico (NMDS)	34
Figura 15. Análisis evolutivo por método de máxima verosimilitud para gen ARN16s	35
Figura 16. Análisis filogenético molecular por método de máxima verosimilitud para gen CytB ..	36
Figura 17. Mapa de patrones de distribución del subgrupo <i>lincolni</i> con variables climáticas del año 2019	37
Figura 18. Mapa de patrones de distribución del subgrupo <i>lincolni</i> con variables climáticas del Holoceno	38
Figura 19. Mapa de patrones de distribución del subgrupo <i>lincolni</i> con variables climáticas para el año 2030	39
Figura 20. Mapa de patrones de distribución del subgrupo <i>lincolni</i> con variables climáticas para el año 2050	40
Figura 21. Mapa de patrones de distribución del subgrupo <i>lincolni</i> con variables climáticas para el año 2070	41

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. BLAST de <i>Bolitoglossa</i> sp. Nov1.....	25
Cuadro 2. BLAST de <i>Bolitoglossa</i> sp. Nov2.....	25
Cuadro 3. Información para especímenes de <i>Bolitoglossa</i> de GenBank y sus vouchers utilizados para los análisis filogenéticos.....	26
Cuadro 4. Tamaño de muestra.....	27
Cuadro 5. Comparación de patas delanteras derechas de salamandras del clado <i>lincolni</i>	30
Cuadro 6. Comparación de patas traseras derechas de salamandras del clado <i>lincolni</i>	31
Cuadro 7. Comparación vista ventral de cabeza y sección gular de salamandras del clado <i>lincolni</i>	32
Cuadro 8. Análisis de componentes principales de <i>Bolitoglossa meliana</i> , <i>Bolitoglossa franklini</i> , <i>Bolitoglossa lincolni</i> y <i>Bolitoglossa</i> sp. Nov.....	33

RESUMEN

La biodiversidad en Guatemala es conocida como una de las más variadas de Mesoamérica, principalmente en (Caudata: Plethodontidae) salamandras teniendo la mayor riqueza a nivel americano. Esta característica se atribuye a la edad geológica y variación tectónica. Sin embargo, la poca cantidad de estudios y la alta variabilidad geográfica de Guatemala favorecen la especiación, permitiendo la aparición de nuevas especies, generando resiliencia o variabilidad genética y el aumento en la diversidad de especies de Guatemala. Es por ello por lo que es indispensable conocer la filogenética y filogeografía de grupos, clados o especies en si para establecer métodos de conservación o alternativas para aprovechamiento de bosques. Sobre todo, el conocer las rutas de colonización de las especies, para localizar variaciones genéticas por aparición de barreras biogeográficas a lo largo del tiempo.

El clado perteneciente al subgénero *Magnadigita* conocido como el “subgrupo *lincolni*” presenta rangos de distribución aislados y el hallazgo de individuos semejantes a los del clado, sugiere especiación alopátrica, por lo que es importante conocer la historia biogeográfica del mismo, para permitir determinar el surgimiento de una nueva especie o subespecie, mediante análisis genéticos y proyecciones de distribución. También provee información del comportamiento de colonización del clado y datos de distribuciones potenciales a futuro. Por ende, este proyecto propone analizar la distribución histórica del clado en el que se sitúa la especie de salamandra negra de Tzunuj. Generando primero su análisis filogenético para ubicarla dentro de un clado y luego realizar los procedimientos comparativos, como lo son mediciones universales de parámetros morfológicos de salamandras, tomando en cuenta veinticinco medidas para tener mayor estándar de comparación.

Se trabajó con dos ejemplares de la finca Tzunuj, a los cuales se les extirpó tejido de varios órganos para la extracción de ADN. Se secuenció la muestra mediante Sanger y luego de la alineación de realizaron dendrogramas, para confirmar la pertenencia al clado. Se procede a la evaluación morfométrica con la medición de las tres especies del clado según Wake y Lynch (1976), siendo estas *Bolitoglossa meliana*, *Bolitoglossa franklini* y *Bolitoglossa lincolni*, para poder realizar el análisis de comparación con la salamandra negra de Tzunuj. Luego se midieron las variables morfológicas, teniendo un total de 64 ejemplares para la medición y dos de la población de Tzunuj. La información fue aglomerada para la generación de un análisis de componentes principales (PCA) que, por la existencia de valores nulos, no se ajustó significativamente a los datos y se apoyó con un análisis de escalado multidimensional no métrico (NMDS) que permite tomar en cuenta todos los valores a pesar de los datos nulos. Con este análisis, se soporta la conjetura que las variaciones morfológicas y el aislamiento de la población de salamandras negras de Tzunuj sean lo suficientemente diferenciadas para

establecerse como nueva especie. Esto se apoyó con la generación de árboles filogenéticos que indican mediante porcentajes la distancia evolutiva de las especies pertenecientes al clado. Finalmente se realizan proyecciones de distribución, generando mapas, de la posible distribución actual, la proyección que existió en el Holoceno y sobre el escenario más drástico de cambio climático se proyectó para los años 2030, 2050 y 2070, evidenciando las áreas indispensables para la conservación de las salamandras del clado *lincolni*.

Las proyecciones y los análisis genéticos indican altas variaciones en dos especies pertenecientes al clado. *Bolitoglossa meliana*, tiende a una mayor variación y a una distancia evolutiva mayor que las demás especies, situándose en un clado totalmente diferente para ambos marcadores analizados. Se sugiere, por tanto, realizar un análisis más exhaustivo tanto genético como de distribución de esta especie ya que, la salamandra negra de Tzunuj coincide con la descripción de Wake (1982) de *Bolitoglossa meliana*, donde el patrón de coloración negro sería el ancestral del clado *lincolni* y que sería la primera en distribuirse a lo largo de las vertientes guatemaltecas.

I. INTRODUCCIÓN

Dentro de Mesoamérica Guatemala es una de las regiones conocidas con mayor diversidad, gracias a las múltiples variaciones geológicas y climáticas con las que cuenta. Algunos de los grupos de organismos vivos que se clasifica como la más diverso, es el de anfibios, dando lugar a múltiples hallazgos de nuevas especies, variaciones morfológicas, subespecies, subpoblaciones, hibridaciones, poblaciones alopátricas, entre otras. En la actualidad se ha demostrado que la diversidad de anfibios de Guatemala se encuentra infravalorada y se tiene una diversidad muy superior a la esperada (Campbell y Smith, 1998; Wake y Campbell, 2000). Uno de estos grupos ampliamente diversos de Guatemala, es el resultado de la mayor radiación de salamandras de la familia Plethodontidae en América Tropical, la cual es una de las radiaciones evolutivas más notables en cuanto a la magnitud del número de especies y a la diversidad de formas morfológicas y ecológicas (Wake y Lynch, 1976; Parra-Olea y Wake, 2001).

La fauna de salamandras que habitan en Guatemala se ha agrupado en 8 de los 13 géneros de salamandras neotropicales pertenecientes a la familia Plethodontidae, *Bolitoglossa*, *Pseudoeurycea*, *Nyctanolis*, *Nototriton*, *Cryptotriton*, *Dendrotriton*, *Oedipina* y *Bradytriton*. De estas *Bolitoglossa* se destaca entre los otros géneros de la familia Plethodontidae debido a su alta diversidad, con 124 especies descritas hasta la fecha (Amphibiaweb 2019). También presenta la distribución geográfica más extensa entre los plelodóntidos: desde el noreste de México hasta la cuenca del Amazonas y en algunas montañas de la región central de Bolivia (Parra-Olea *et al.* 2004).

Dentro de Guatemala, se propone que las tierras altas son uno de los centros de la radiación de estos individuos, destacando que las variables de temperatura, precipitación y altitud son las que más influyen en su presencia. Esta característica da lugar a que se encuentren mayormente en bosques altos nubosos, clasificados según Holdridge (1950) en la zona de vida de Bosque Pluvial Montano Bajo Subtropical. Dentro de esta zona de vida se localiza la finca Pamac que cuenta con las áreas de Sach Wach Ja y Tzunuj, esta área cuenta con bosques altamente conservados, que estaban destinados únicamente a la extracción de chipe hasta el 2000. Por ende, se cuenta con una amplia variedad de especies indicadoras de buena calidad de hábitat, característica ejemplar de la mayoría de los anfibios, principalmente salamandras. Las salamandras de la familia Plethodontidae carecen de la presencia de pulmones por lo que dependen de una buena calidad de hábitat para poder tener un ambiente lo suficientemente puro para el intercambio gaseoso a través de la humedad de la piel. El hallazgo de un espécimen de la familia Plethodontidae, género *Bolitoglossa* con características totalmente diferenciadas a las especies del género, lleva a un estudio más profundo de la población de salamandras negras presentes en Tzunuj, para discernir la posibilidad de su novedad.

Para establecer de una manera concreta que es una nueva especie, deben llevarse a cabo estudios comparativos, tanto morfológicos como genéticos y análisis evolutivo o patrones históricos de distribución, para discernir o establecer el origen de la población. Sin embargo, una limitante para este grupo es que la evolución y biogeografía histórica no está del todo comprendida, respaldada por análisis de ADN mitocondrial, dando lugar en Guatemala que aún se pueda proponer un escenario evolutivo completo (Parra-Olea, 2006).

Por ende, este proyecto propone analizar la distribución histórica del clado en el que se sitúa la especie de salamandra negra de Tzunuj. Generando primero su análisis filogenético para ubicarla dentro de un clado y luego realizar los procedimientos comparativos, como lo son mediciones universales de parámetros morfológicos de salamandras, tomando en cuenta veinticinco medidas para tener mayor estándar de comparación. Se trabajó con dos ejemplares de la finca Tzunuj, a los cuales se les extrajo tejido de varios órganos para la extracción de ADN. Se secuenció la muestra mediante Sanger y luego de la alineación de realizaron dendrogramas, para confirmar la pertenencia al clado. Se procede a la evaluación morfométrica con la medición de las tres especies del clado según Wake y Lynch (1976), siendo estas *Bolitoglossa meliana*, *Bolitoglossa franklini* y *Bolitoglossa lincolni*, para poder realizar el análisis de comparación con la salamandra negra de Tzunuj. Luego se midieron las variables morfológicas, teniendo un total de 64 ejemplares para la medición y dos de la población de Tzunuj. La información fue aglomerada para la generación de un análisis de componentes principales (PCA) que, por la existencia de valores nulos, no se ajustó significativamente a los datos y se apoyó con un análisis de escalado multidimensional no métrico (NMDS) que permite tomar en cuenta todos los valores a pesar de los datos nulos. Con este análisis, se soporta la conjetura que las variaciones morfológicas y el aislamiento de la población de salamandras negras de Tzunuj sean lo suficientemente diferenciadas para establecerse como nueva especie.

Los análisis morfométricos se sustentaron con la generación de dos árboles filogenéticos de máxima verosimilitud con el modelo de Tamura-Nei, para los genes ARN16s y citocromo B. Donde se indica que la salamandra negra de Tzunuj tiene un alto porcentaje de asociación a dos especies del clado del subgrupo *lincolni*, *Bolitoglossa franklini* y *Bolitoglossa lincolni*. Para fortalecer esta ubicación dentro del árbol, se generan mapas históricos para conocer posibles rutas de colonización del clado de variables climáticas durante el Holoceno y las actuales. Con esto, puede hipotetizarse que el ancestro del clado cuenta con coloración negra y proviene de la vertiente pacífica de Cuilco, México.

Para sustentar y sugerir métodos de conservación de las salamandras del clado, se generan mapas con proyecciones a futuro para priorizar áreas de conservación y conocer las variables climáticas más influyentes.

II. ANTECEDENTES

A. Clasificación de anfibios

Amphibia es la familia de tetrápodos que engloba a todos los organismos conocidos como anfibios, se divide en tres subclases de las cuales dos están extintas y la tercera, Lissamphibia, incluye a todos los anfibios vivos. En esta subclase se incluyen tres órdenes: Gymnophiona (Cecílicos), Caudata (Salamandras), y Anura (Sapos y Ranas). Se conocen más de 6500 especies de anfibios que habitan todos los continentes, exceptuando las regiones árticas y los desiertos más áridos. Los adultos tropicales son principalmente terrestres o arbóreos, mientras que pocos son estrictamente acuáticos (Gouts 2011).

En la Figura 1 se puede observar el número de especies aproximado de anfibios por país, cada color representa el rango en el que éste se encuentra, dando así una perspectiva de su distribución a nivel mundial (Bertonatti 1994). A nivel mundial, las regiones tropicales, presentan características esenciales para el desarrollo de anfibios, estas involucran patrones climáticos, microhábitats delimitados y la ausencia de grandes depredadores. Para los anfibios es indispensable la presencia de humedad en el ambiente para poder realizar el intercambio gaseoso. Se conoce que para Amphibia una de las áreas más importantes se encuentra desde San Luis Potosí, México, hacia el sur hasta Bolivia que cuenta con una precipitación media anual entre 700-2500mm (FAO, 2015). Centroamérica nuclear, el área entre el istmo de Tehuantepec y la depresión nicaragüense, es uno de los centros de diversidad de este grupo (Wake y Lynch, 1976).

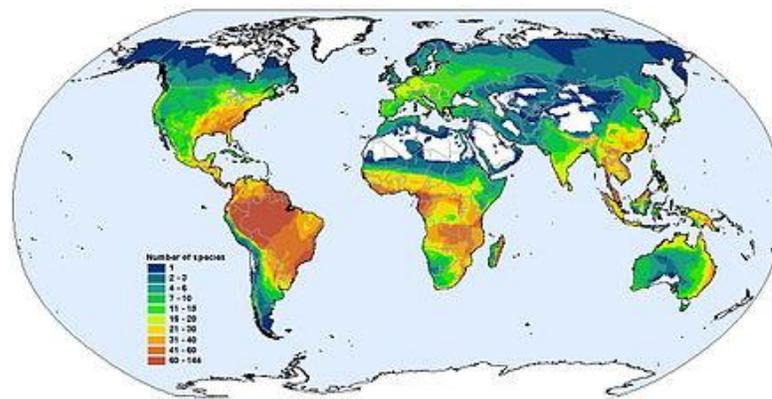


Figura 1. Distribución de especies de anfibios a nivel mundial

(Adaptada de: Bertonatti, 1994)

B. Características generales de Caudata

Los anfibios cuentan con una piel como una estructura desnuda, sencilla, permeable al agua, muy vascularizada, llena de una multitud de glándulas cutáneas, que llevan a cabo una serie de funciones vitales en los anfibios al protegerlos contra la abrasión y agentes patógenos. Muchos anfibios poseen glándulas, conocidas como glándulas granulares, las cuales secretan un moco líquido e incoloro que previene la desecación, mantiene el equilibrio iónico, además de la producción de compuestos biológicamente activos y de toxicidad variable tales como aminas biogénicas, alcaloides o péptidos (Hickman 2001). Otras de las funciones de la piel, lo constituye la respiración cutánea, la regulación de la absorción de agua, la contribución del cambio a las pigmentaciones, como un sistema de protección y/o comunicación, en algunas especies y el control de la temperatura corporal (Goraya 2000). Gracias a esto, la piel actúa muchas veces como un medio de defensa contra depredadores ya que, algunas poseen glándulas venenosas y pigmentaciones de advertencia (Stebbins 1997).

Los caudatos presentan, por lo general, cuatro extremidades. La boca alcanza gran tamaño y, en ocasiones, presentan pequeños dientes débiles, maxilares y vomerianos. Son animales engullidores, puesto que introducen en su tubo digestivo a sus presas sin masticar previamente (Hickman 2001)

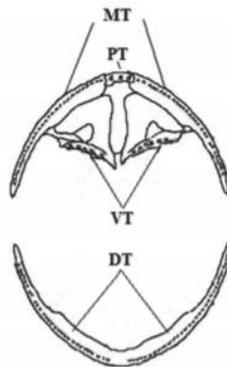


Figura 2. Diagrama de dientes de plelodóntidos, señalando maxilares (MT), vomerinos (VT) y premaxilares (PT)

(Adaptado de Caravahlo, 2013).

En cuanto a la ecología de las salamandras, la mayoría son parcial o completamente arbóreas, habitando en bosques nubosos o bosques montanos húmedos en su mayoría. En comparación con la mayoría de los vertebrados las salamandras tropicales tienen rangos de distribución relativamente pequeños, con endemismo local más característico para las de bosques nubosos, mientras que las de hábitats de tierras bajas tienen rangos geográficos más extensos (Wake y Lynch, 1976)

C. Distribución de *Caudata*

Caudata se encuentra ausente en los trópicos del viejo mundo, mientras que casi 150 especies (cerca de la mitad del total mundial) se encuentran en latitudes tropicales en América Central y del Sur. El rango total de salamandras en los trópicos está dividido en trece regiones faunísticas, incluyendo de una a cuarenta especies; sin embargo, en América Central la variación de abundancia de especies entre regiones faunísticas se encuentra ligado a factores topográficos y climáticos, siendo las tierras altas la influencia más importante (Wake y Lynch, 1976).

En el neotrópico, las salamandras de la familia Plethodontidae son representadas por un único linaje del supergénero *Bolitoglossa*. Muchas áreas de Mesoamérica son ricas en salamandras, sin embargo, una de las áreas de mayor diversidad son las tierras altas de Guatemala occidental (Wake y Lynch, 1976).

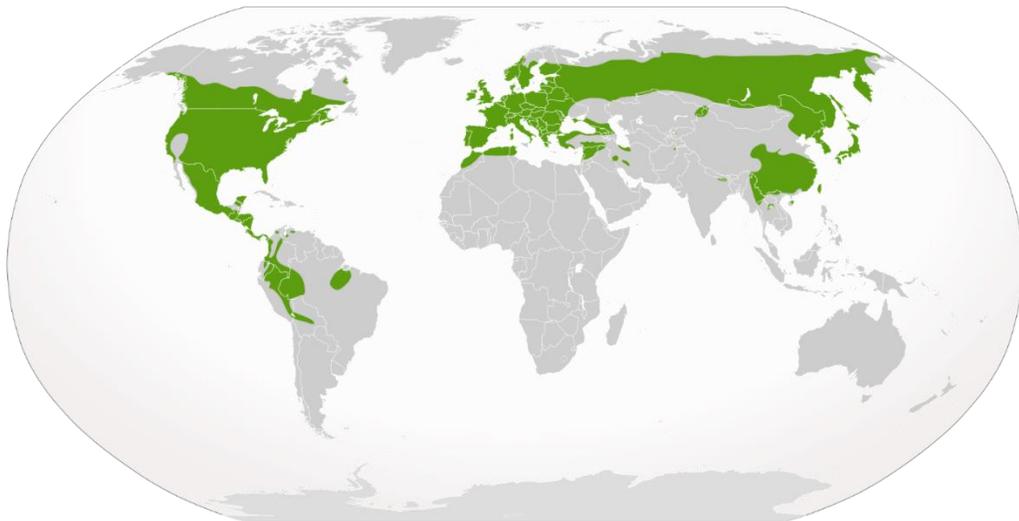


Figura 3. Distribución mundial de Caudata

(adaptada de: Jones, 2010)

D. Familia Plethodontidae

Los pletodóntidos, salamandras conocidas por no tener pulmones, pertenecen a la familia Plethodontidae, es considerada como una de las familias de anfibios caudados más amplia; constando de 26 géneros y más de 300 especies; sin embargo, su taxonomía aún sigue siendo de un amplio debate, definiéndose especies nuevas regularmente. (Vásquez-Almazán *et al.*, 2009; Campbell *et al.*, 2010; Rovito *et al.*, 2010; Brodie *et al.*, 2012). La familia Plethodontidae está clasificada en el suborden caudado Salamandroidea (Duellman y Trueb, 1986) que agrupa

todas las salamandras que realizan fertilización interna. Sin embargo, Estes (1981) reconoce anteriormente un suborden separado (*Plethodontoidea*) para la familia Plethodontidae.

Tradicionalmente, Plethodontidae se subdividió en dos subfamilias: Desmognathinae y Plethodontinae, la última de las cuales se subdividió en las tribus Bolitoglossini, Hemidactyliini y Plethodontini (Wake, 1966; Lombard y Wake, 1986). Sin embargo, los análisis filogenéticos con secuencias de ADN genómico mitocondrial completo (Macey, 2005; Mueller et al., 2004) y la combinación de ADN mitocondrial, ADN nuclear y morfología (Chippindale et al., 2004) han puesto en duda la monofilia de estos grupos.

Se caracterizan por la ausencia de pulmones, realizando su intercambio gaseoso a través de la piel y algunas membranas recubiertas de mucosa a lo largo de la garganta y en la boca (Bucofaríngea), todas las salamandras tropicales se caracterizan por tener una lengua extremadamente larga que funciona como proyectil y se encuentra adherida a la cadera (Larson et al., 2006; Köhler, 2011). Son únicas entre las salamandras por tener surcos estrechos entre cada fosa nasal y el labio superior. En época reproductiva los machos a menudo tienen protuberancias en el labio superior asociadas con los surcos nasolabiales y una glándula mental ubicada debajo de la boca.

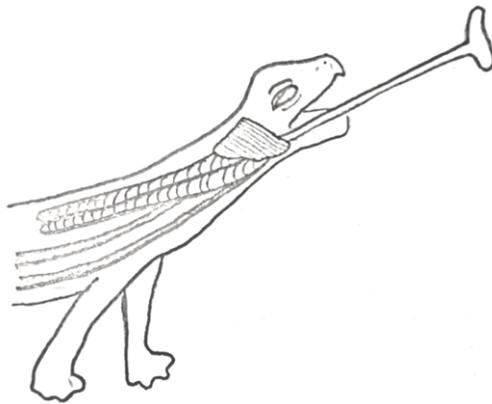


Figura 4. Diagrama de lengua de pletodóntidos asemejando proyectil.

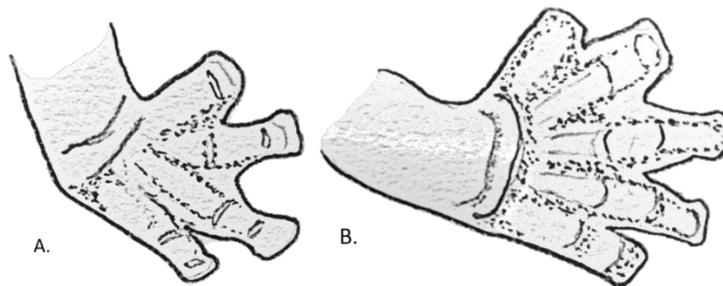


Figura 5. Diagrama de extremidades delantera (A) y trasera (B) de pletodóntidos.



Figura 6. Diagrama de cabeza de pletodóntido macho con surcos nasolabiales protuberantes.

La mayoría de las pletodóntidos son completamente terrestres y ponen huevos en tierra (subfamilias Bolitoglossinae y Plethodontinae y tres especies del supergénero *Desmognathus*). Algunos tienen un ciclo de vida bifásico con una larva acuática y un adulto terrestre (la mayoría de los miembros del supergénero *Desmognathus* y la subfamilia Hemidactyliinae), y otros son completamente acuáticos y de forma larval permanente (algunos miembros de la subfamilia Spelerpinae). Las formas acuáticas habitualmente habitan corrientes. Todos los pletodóntidos tienen surcos costales altamente pronunciados.



Figura 7. Diagrama de salamandra con surcos costales fuertemente pronunciados y localización de cloaca.

Los miembros de la familia Plethodontidae, habitan en zonas con mucha humedad (cuevas, debajo de piedras, hojarasca, etc.), indispensable para poder respirar a través de su piel. Ocupan una gran diversidad de zonas adaptativas que van desde las estrictamente acuáticas hasta las estrictamente terrestres e incluso arbóreas (Wake, 1966; Larson, 1984). Se cree que los ancestros de los pletodóntidos fueron semiacuáticos, con larvas acuáticas con branquias que habitaban en arroyos pasando por una metamorfosis dando lugar a adultos que muestran diversos rasgos terrestres. Wake y Larson (1987) discuten los patrones evolutivos morfológicos y sus relaciones con la diversificación adaptativa de las salamandras.

Todas las salamandras centroamericanas pertenecen a la familia Plethodontidae y a la subfamilia Bolitoglossinae que cuenta con 13 géneros y aproximadamente 220 especies. Las especies de esta subfamilia se distribuyen desde Nueva Escocia y el extremo sureste de Alaska

hacia el sur, llegando al este de Brasil y centro de Bolivia. Mesoamérica es el centro de diversidad más importante de este grupo, con 13 géneros actualmente conocidos y 220 especies (Köhler, 2011). Guatemala cuenta con un único *Bolitoglossa* y según extensos estudios de campo de Schmidt (1936) y Stuart (1943) es el área más diversa y rica de salamandras con nuevos hallazgos (Campbell y Smith, 1998).

E. Género *Bolitoglossa*

Bolitoglossa se destaca entre los otros géneros de la familia Plethodontidae debido a su alta diversidad, con 124 especies descritas hasta la fecha (Amphibiaweb 2013). También presenta la distribución geográfica más extensa entre los plethodóntidos: desde el noreste de México hasta la cuenca del Amazonas y en algunas montañas de la región central de Bolivia (Parra-Olea *et al.* 2004). Este grupo sufre una extensa radiación evolutiva en los trópicos del Nuevo Mundo, incluidos los grupos altamente arbóreos y fosoriales (Wake y Lynch, 1976). Orígenes evolutivos, tanto paralelos como convergentes permiten que en el género *Bolitoglossa* se observen membranas interdigitales amplias, asociado a su hábitat arborícola en una vegetación húmeda y también a sus formas alargadas y fosoriales con la característica principal de lengua en forma de hongo (Wake y Lynch, 1976; Alberch, 1981).

Los miembros de *Bolitoglossa* presentan extensas membranas interdigitales, varios surcos costales entre las extremidades y la ausencia de un pliegue sublingual (Wake 1966; Wake y Elias 1983). A pesar de la gran diversidad del género, se pueden observar convergencias morfológicas y morfologías conservadoras, que dificultan el establecimiento de la relación filogenética y la delimitación de especies (Wake 1966, 1970; Wake y Lynch 1976; Crump 1977, Larson y Chippindale 1993; Campbell *et al.* 2010; Fermin *et al.* 2012).

F. Salamandras de Guatemala

La familia Plethodontidae dentro del Neotrópico, está representada únicamente por un linaje, el supergénero *Bolitoglossa*. Dentro de las áreas más diversas y ricas para Mesoamérica esta Guatemala (Wake y Lynch, 1976), debido a su variedad topografía y la edad geológica de muchas de estas y la compleja topografía (Marshall, 2007) dando lugar a presentar áreas con aislamiento geográfico, permitiendo la presencia de altos endemismos y mucha variación alopatrica.

La mayor diversidad se encuentra vinculada a los Bosques Nubosos y Bosques tropicales húmedos. Ambos ecosistemas han sido identificados como ecosistemas forestales con altos niveles de endemismo, particularmente a consecuencia de las condiciones climáticas que los caracterizan restringen su distribución y biodiversidad (Rovito *et al.* 2015; Ramírez-Bautista y Cruz-Elizalde, 2013). Según Islebe y Véliz (2001), estos bosques se caracterizan por tener

precipitación horizontal y una vegetación compuesta por una gran abundancia de plantas epífitas, musgos y helechos arborescentes. En Guatemala estos se encuentran principalmente en Sierra de las Minas, la cadena volcánica, en los Cuchumatanes y en el Corredor Biológico del Bosque Nuboso de Baja Verapaz. La alta sensibilidad a cambios ecológicos de un grupo como las salamandras permite indicar la calidad de un ecosistema (Landres *et al.*, 1998).

Estas características geográficas, permiten una recurrente especiación dentro del territorio, dando lugar a la presencia de aproximadamente 67 especies en Guatemala.

G. Sub-grupo *lincolni*

El subgrupo *lincolni* está compuesto por un complejo de salamandras estrechamente relacionadas localizadas dentro del subgénero *Magnadigita*. Se caracterizan por tener un tamaño grande (mayor a 6mm SVL), son animales robustos con color de fondo negro. La mayoría de las especies del grupo están notablemente marcadas por parches, rojos, amarillos o verdoso plateados y se han encontrado de coloración completamente negra (Wake y Lynch, 1976; Wake y Lynch, 1982). Las patas cuentan con dígitos moderadamente largos, bien formados, robustos y poco tejido, como se encuentra en todo el género. Sin embargo, estas cuentan con dedos alargados y con membrana interdigital que llega a cubrir hasta la penúltima falange dejando descubiertas las puntas de los dedos.

Al subgrupo actualmente lo conforman tres especies, *Bolitoglossa meliana*, *Bolitoglossa franklini* y *Bolitoglossa lincolni*. *Bolitoglossa meliana* es uniformemente negra y es la que alcanza un tamaño mucho mayor a las demás, esta fue descrita en 1982 por Wake y Lynch, se encuentra en bosques de tierras altas que van desde pino-encino relativamente secos hasta bosques nubosos con elevaciones entre 1550-2730msnm como lo es la Sierra Chuacús en Quiché y Baja Verapaz. *Bolitoglossa lincolni* tiene patrones dorsales de coloración rojiza, habita en bosques de pino-encino y ciprés relativamente secos, y se encuentra también en otras localidades de bosque nuboso entre los 2000 y 3000msnm (Campbell y Vannini 1989; Wake y Lynch, 1982). Mientras que *Bolitoglossa franklini* tiene patrones distintivos color amarillo o verde, esta está restringida exclusivamente a bosques nubosos casi entrando a bosque montano a aproximadamente 1500-3000msnm (Wake *et al.*, 1980). *Bolitoglossa franklini* está restringida a localidades en las laderas del pacífico, mientras que *B. lincolni* cuenta con una distribución más amplia en laderas del Pacífico y el oeste de Guatemala.



Figura 8. *Bolitoglossa meliana* (Imagen adaptada de CalPhotos)



Figura 9. *Bolitoglossa lincolni* (Imagen adaptada de CalPhotos)



Figura 10. *Bolitoglossa franklini* (Imagen adaptada de CalPhotos)

H. Filogeografía y sistemática

Para conocer patrones de aislamientos y posibles barreras biogeográficas que permitan la alopatria en especies, es indispensable conocer patrones filogeográficos. En grupos con poca variabilidad morfológica como lo es el subgrupo *lincolni*, es preciso conocer los flujos genéticos y más que todo patrones geográficos que sean los que permitan aislamiento. Para generar esta información también es funcional la herramienta de la sistemática que localiza dentro de la filogenia del grupo a posibles variaciones, nuevas especies o subespecies dentro de un clado.

Las variaciones o límites de los taxones crípticos se establecen mediante filogeografía o sistemática molecular y gracias a ello se logra comprender orígenes y diversidad a nivel de especie (Foque *et al.*, 2007; Hanken, 1983; Bickford *et al.*, 2006). Una alta diversidad genética dentro de un taxón para una región pequeña, indica una historia con un cambio ambiental persistente, mientras que cuando existen interrupciones genéticas entre poblaciones sugieren una historia demográfica mucho más compleja que involucra periodos de aislamiento o flujos genéticos restringidos (Rovito, *et al.* 2012). Existen variantes alopátricas y dentro de ello también se engloban barreras climáticas o accidentes geológicos que causan esas rupturas filogeográficas y se puede suponer su resultado en aislamiento de poblaciones. Ideando que para la mayoría de los taxones el modo de especiación geográfica dominante es la divergencia alopátrica, lo principal es comprender que barreras son las que han llevado a la divergencia dentro de la especie de interés, para dilucidar el impacto de tales barreras en una escala de tiempo más amplia.

La comprensión de factores históricos, para resultar en una especie o la divergencia de la población, es de alto interés para las áreas que presentan una alta diversidad de especies como las regiones tropicales húmedas. Existen diversos métodos para la generación y búsqueda de información genética, como lo son genes que cuentan con regiones altamente conservadas, regiones con información de ADN mitocondrial entre otros más específicos. Estos se conocen como marcadores moleculares, los cuales permiten la investigación básica de análisis filogenéticos o aplicada como la selección asistida; Se centran en la aplicación a la caracterización de diversidad de los recursos zoo genéticos y búsquedas de variantes funcionales de determinados genes. Los marcadores de ADN mitocondrial (mtADN) son utilizados en análisis filogenéticos y de diversidad genética ya que, son altamente conservados por ser heredado únicamente por la madre, también presentando una alta tasa de mutación por la ausencia de recombinación (FAO, 2010). Los marcadores mitocondriales permiten la rápida detección de hibridación entre especies o subespecies (Nijman *et al.*, 2003).

Los marcadores más utilizados para reconstrucción filogenética y localización de subespecies o nuevas especies son los siguientes:

- 16 S rARN: En esta región se encuentran genes que se utilizan para la reconstrucción filogenética debido a que esta zona presenta una baja tasa de evolución (Woose y Fox, 1997) Esta baja tasa de evolución permite determinar fácilmente entre organismos de distintas especies, así como la relación entre las especies. Si bien este marcador fue utilizado al inicio para diferenciación entre bacterias, se ha demostrado que puede utilizarse con una gran variedad de animales, ya sea vertebrados e invertebrados (Mindell y Honeycutt, 1990), y a través de éste determinar con seguridad al menos hasta género. Esta secuencia de ARN es una herramienta útil en diversas situaciones para la identificación de especies.
- Citocromo B (CytB): Se utiliza comúnmente para estudiar relaciones filogenéticas entre mamíferos, ya que es un gen del cual se posee una gran cantidad de información para diversas especies de mamíferos. Además, la variabilidad de la secuencia permite comparar fácilmente entre especies del mismo género o familia de cualquier vertebrado (Castresana, 2000). Contiene una alta proporción de sustitución de nucleótidos causada por la evolución, lo que la hace particularmente valiosa para discriminar entre vertebrados estrechamente relacionados. La disponibilidad de una región conservada del gen en los vertebrados también hace que el ADN mitocondrial del gen de citocromo b sea un buen candidato para la identificación por PCR (Guo, *et al.*, 2012).

I. Geología y topología de Guatemala

América Central abarca un amplio mosaico de paisajes dinámicos con muchos procesos de la superficie terrestre, es de las pocas regiones del mundo con tanta diversidad geomórfica, debido a que, a lo largo del pequeño istmo todos los dominios tectónicos, litológicos y climáticos son altamente variables. Cada región de América Central tiene un conjunto diferente de relieves permitiendo conservar una historia única de evolución del paisaje (Marshall, 2007). La peculiar geología de Mesoamérica se remonta a la subducción Cenozoica de la placa oceánica de Cocos y la placa Farallón que sucedió debajo del margen occidental de la placa del Caribe (Weyl, 1980; Denego, 1968; Gardner, *et al.*, 1987); mientras que el frente volcánico se desarrollaba al norte en el Paleozoico con los bloques maya y chortis y el bloque volcánico sur se formó en el fondo del océano con la placa caribeña conformando los bloques chorotega y chocó.

Las variaciones en el suelo del fondo del océano a lo largo del Cenozoico dan origen a un conjunto diverso de formaciones rocosas. Estas son generadas debido a la variedad de configuración tectónica, incluyendo cordilleras volcánicas, cuencas, zanjas, llanuras, deltas,

valles, mesetas, etc. La aparición de los anfibios esta datada hace 350 millones de años (Cox *et al.*, 2016), dando lugar a la especiación por alopatría. Es muy probable que esta gran diversidad de salamandras sea producto de la gran edad geológica de muchas de estas tierras altas (Marshall, 2007), así como de la compleja topografía de la región.

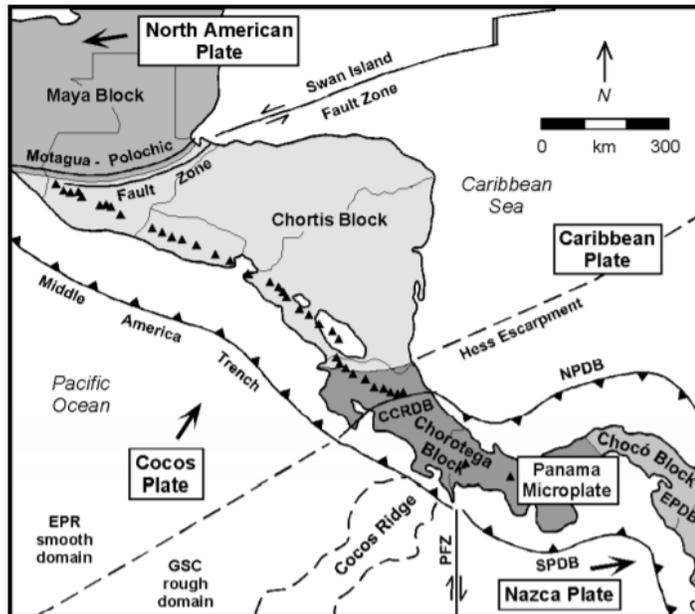


Figura 11. Mapa de composición tectónica de Centro América

(Adaptado de Marshall, 2007)

Ventajosamente, para la diversidad dentro de Guatemala el estar situada en Mesoamérica no es su única característica, sino que es geológicamente compleja porque se encuentra en la intersección de las placas de América del Norte y el Caribe. Es gran interconexión para el área entre el istmo de Tehuantepec y la depresión nicaragüense (Schuchert, 1935), se divide en dos grandes bloques geológicos: el bloque maya y el bloque de Chortí (Marshall, 2007). Estos dos bloques se encuentran a lo largo de la zona de falla Motagua-Polochic creando un área rugosa y elevada que se extiende aproximadamente de este a oeste a través del centro de Guatemala. La Sierra de las Minas, que alcanza más de 3,000 m de altura, y la Sierra de Chuacú se encuentran entre las fallas de Motagua y Polochic, y los valles a lo largo de cualquier zona de falla separan la Sierra de las Minas de otras áreas de las tierras altas al norte y sur. El Valle de Motagua en particular, un área de baja elevación con vegetación semiárida (Stuart, 1954), es una barrera biogeográfica importante para múltiples taxones (Castoe *et al.*, 2009; Daza *et al.*, 2010) y divide las áreas forestales de mayor elevación a cada lado. Estas fuertes barreras geográficas han llevado a un alto endemismo en la Sierra de las Minas y Sierra de Chuacús, tanto en salamandras como en el resto de los anfibios (Campbell *et al.*, 2010; Rovito *et al.*, 2010).

III. JUSTIFICACIÓN

Los estudios con mayor influencia sobre salamandras se llevaron a cabo por Brocchi en 1883, que fue enviado por las expediciones francesas para la investigación de las tierras guatemaltecas. Luego los estudios con mayor influencia para las salamandras en Guatemala se condujeron por la Universidad de California en Berkeley desde 1969 hasta 1979 los cuales se enfocaron en el oeste de Guatemala, dándole prioridad a la cordillera Volcánica, San Marcos, Huehuetenango y algunas regiones del Altiplano Central. Los estudios exhaustivos más recientes fueron impartidos por la Universidad de Texas Arlington en los ochentas y principio de los noventa, describiendo muchas nuevas especies (Campbell y Smith 1998; Wake y Campbell 2000). Estas expediciones dieron lugar a que se publicaran decenas de documentos donde se reporta el hallazgo de nuevas especies en la región y además se describen las relaciones ecológicas, de hábitat, filogenia y distribución de la fauna de salamandras (Wake & Brame, 1969; Wake & Elias, 1983; Elías, 1984; Wake, *et al.*, 1992).

El hallazgo de una posible nueva especie permite que esta investigación sea de gran importancia debido a que provee información de las variantes biogeográficas en las que habita el clado, presentando un patrón posible para las posibles rutas de migración de los individuos, con lo que se permitiría generar e identificar áreas de importancia para la conservación y para mantener la alta biodiversidad o también puede dar indicios de patrones de aislamiento en resultado de variantes morfológicas. Así mismo, se podrá generar más información que permita entender de mejor manera la historia del clado y posibles razones de la segregación de especies, y con ello identificar procesos de alopatria por aislamiento y las posibles razones de variantes morfológicas y la importancia de ellas.

Acevedo *et al.* (2008), proponen que *Bolitoglossa lincolni* está dentro de la categoría de casi amenazada, al igual que proponen a *Bolitoglossa meliana* como amenazada, también Parra-Olea *et al.* (2008) a *Bolitoglossa franklini* dentro de la categoría de amenazada, lo que sitúa al clado del “subgrupo *lincolni*” en alta vulnerabilidad según la lista roja de la IUCN. Sin embargo, la variabilidad geográfica de Guatemala permite la especiación, dando lugar a la aparición de nuevas especies, permitiendo tener una resiliencia o variabilidad genética y un aumento en la diversidad de especies de Guatemala. Debido a la escasez de información respecto a posibles razones de especiación es importante analizar tanto de manera biogeográfica como genética al clado, evaluando posibles nuevas especies, subespecies o hibridaciones.

Los miembros del “subgrupo *lincolni*”, se encuentran en las tierras altas sedimentarias, asociado a bosques pluvial subtropical y muy húmedo subtropical según Holdridge (2001) de Guatemala, los cuales se encuentran altamente amenazados por variaciones climáticas y el

cambio de los patrones de lluvia, unido a las prácticas forestales insostenibles y la conversión del bosque en tierras agrícolas. Estos bosques, además de su alta biodiversidad, tienen alto valor por los bienes y servicios ecosistémicos que proveen como agua, madera, etc.

Para conocer la importancia de la biodiversidad de Guatemala, es necesario también conocer los orígenes de esta diversidad, entendiendo la importancia de las barreras biogeográficas y los microclimas que se desenvuelven a lo largo de un territorio. El condensar estudios biogeográficos, genéticos y morfológicos ayudan a conocer los orígenes evolutivos de las especies. Es el caso de este estudio, que es el primero en reunir toda la información sobre un clado, para conocer los patrones históricos de colonización, dispersión y actual distribución, junto con las variantes morfológicas que ha tenido el subgrupo *lincolni* para dar como resultado la existencia de las posibles cuatro especies pertenecientes al mismo.

Se han realizado estudios para conservación de especies conociendo los patrones actuales de distribución y tomando en cuenta las características actuales derivadas, sin embargo, no se ha realizado una retrospección para conocer de dónde vienen estas características. Para poder concluir que la especie negra de Tzunuj es una nueva especie, se busca comparar con las demás especies del clado y con esto resultar en información propia del clado para planes de conservación, tomando en cuenta los patrones de distribución y sobre todo conociendo de dónde vienen estas salamandras y así identificar variantes tanto genéticas como morfológicas que puedan ser propiamente debido a variables del clima en que se han desenvuelto y por ende resultado en aislamiento, tanto genético como geográfico.

IV. OBJETIVOS

A. General

Desarrollar un análisis filogenético y filogeográfico de cuatro especies de salamandras, del “subgrupo *lincoln*” en parches de bosque nuboso.

B. Específicos

1. Descripción biogeográfica del clado mediante proyecciones, considerando variables climáticas de humedad y precipitación mediante el modelo MAXENT.
2. Alineación de secuencias correspondientes a genes ARN16s y CytB de salamandras de la familia Plethodontidae, con características del “subgrupo *lincoln*”.

V. HIPÓTESIS

Los individuos de salamandras analizados mediante filogeografía, filogenética y morfología, presentan aislamiento filogeográfico, propiciando la presencia de especies nuevas de salamandras dentro del subgénero *Magnadigita* en el clado “subgrupo *lincoln*”.

VI. METODOLOGÍA

La metodología consta de tres fases, la primera involucró el análisis histórico de la distribución de las salamandras del “subgrupo *lincolni*” para Guatemala, pero haciendo énfasis en los bosques nubosos. El segundo involucró la revisión, medición y registro de coordenadas de individuos del clado *lincolni*, localizados en colecciones de la Universidad del Valle de Guatemala e individuos del Museo de la Universidad de Texas Arlington, para la generación de mapas de distribución y poder generar las proyecciones en el tiempo, según las variables climáticas. La tercera constó del análisis genético junto con la alineación de secuencias genéticas vinculadas con los genes ARN16s y CytB.

A. Sitios de estudio

1. Recolección de muestras de campo

El muestro de especies se realizó tanto en campo, como a través de visitas a colecciones y revisión bibliográfica. El estudio enfocó el trabajo de campo en la región de San Cristóbal Verapaz, Alta Verapaz, por ser un área poco estudiada y no contar con registros de salamandras. Para lo cual se seleccionó la Finca Tzunuj, por poseer un remanente de bosque nuboso y ser un buen macizo de bosque nuboso. Se encuentra cerca de la aldea el Chiborrón en el municipio de San Cristóbal Verapaz en el departamento de Alta Verapaz. Posee una extensión aproximada de 670 hectáreas y un clima frío con temperaturas promedio de 16-23°C. Presenta una altitud aproximada de 2000 msnm, precipitación promedio anual 3250 mm, además hay lluvia horizontal permanente en el área lo que mantiene su humedad (Ramírez, 1998). Esta finca pertenece a la región de Bosque Pluvial Montano Bajo Subtropical compuesta principalmente por especies de bosque latifoliado, musgos y helechos (Ramírez, 1998). Dos de los muestreos se realizaron durante la época seca en las fechas del 2-4 de marzo y del 6-9 de abril; el último muestreo se realizó en época lluviosa del 1-5 de junio del 2018. Se siguió la metodología de caminatas por encuentro visual (VES) (Crump y Scott, 1994)

Se encontraron salamandras en varios estadios, a la altura de la rodilla postradas sobre helechos, de estas se eligieron dos para la identificación morfológica y posterior extracción para análisis genético.

2. Recolección de datos de individuos almacenados

Se solicitó permiso para la toma de datos a Colecciones Biológicas de la Universidad del Valle de Guatemala y a la Universidad de Texas Arlington donde se almacenan individuos guatemaltecos desde la década de los setenta.

B. Sujetos de estudio

1. Individuos colectados

Se seleccionaron 2 individuos adultos, preferentemente del sexo masculino con un SVL mayor a 5.5. Para la eutanasia se suministraron 3ml de lidocaína. Luego se extrajeron del lado derecho abdominal, tejidos como hígado, corazón y músculo. Se fijaron las salamandras para su almacenaje con 2ml de formol 10% y luego se colocaron en frascos con etanol al 70%.

2. Muestras almacenadas

Para las salamandras del clado, especies *Bolitoglossa lincolni*, *Bolitoglossa franklini* y *Bolitoglossa meliana*, se realizaron mediciones y toma de datos de ubicación de colectas de individuos de colecciones de UVG y del Museo de UTA. Se tomarán veinticinco medidas universales con un vernier electrónico; distancia de la trompa a la cloaca (SVL), tamaño estándar (SL), largo de la cola (TL), distancia de la trompa a la axila (SA), distancia axilar (AG), largo de pierna delantera (FL), largo de pierna trasera (HLL), distancia de la trompa al saco gular (SG), cantidad de surcos costales, surcos costales entre patas, ancho pectoral (PECW), ancho de pata delantera derecha (HW), ancho de pata trasera derecha (FW), tamaño del tercer dedo de la pata delantera derecha (LiiiF), tamaño del tercer dedo de la pata trasera derecha (LiiiT), tamaño del quinto dedo de la pata trasera derecha (LvT), ancho del ojo (EW), ancho de cabeza (HW), distancia entre ojos (DBE), ancho de la glándula mental (LMG), distancia entre narina y ojo (EN), distancia entre narinas (DN), dientes vomerianos derechos e izquierdos (VT), dientes maxilares derechos e izquierdos (MT) y dientes premaxilares (PT).

3. Procesamiento de muestras para análisis de ADN

Se realizaron dos métodos de extracción para tener respaldo de resultados y éxito en la purificación de las muestras.

a. Metodología de extracción de ADN según Jain *et al.* (2007)

Extracción de ADN

Se pesaron 250 mg de cada tejido de las salamandras de interés correspondientes, *Bolitoglossa* sp. nov. 1 y *Bolitoglossa* sp. nov. 2. A esto se agregaron 500µl de buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 100 mM NaCl, 2% SDS y 150 µg/ml Proteinasa K). Luego se llevó a incubación (Incubadora: Boekel shake and bake) prolongada por 4 horas a 55°C, hasta desintegrar el tejido. Al obtener el tejido desintegrado, se centrifugó (Centrífuga: Eppendorf 5415D) por 10 minutos a 14,000xg.

Al obtener el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo agregando un volumen de fenol saturado de TRIS agitando por inmersión para repetir la centrifugación (10 min x 14,000xg).

Luego de obtener el sobrenadante de ADN purificado con fenol se transfiere a un nuevo tubo. Se agregó 1 volumen de Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) homogenizando por inversión. Con lo que se prosiguió con otra centrifugación a 14,000xg por 8 minutos para transferir la fase acuosa a un nuevo tubo agregando 1 volumen de isopropanol y 1/20 de acetato de sodio (3M, pH 5.5), luego se agitó por inmersión e incubó por 10 minutos a -20°C. Al finalizar la incubación centrifugar por 10 min (14,000xg).

Purificación

Se descarta el sobrenadante de isopropanol y acetato de sodio y se lava el precipitado con 300µl de EtOH70%. El precipitado con etanol se centrifugó por 5 minutos (14,000xg) para luego descartarlo y secar el precipitado en papel secante. Por último, se disolvió el precipitado en 300µl de H₂Odd.

Cuantificación de ADN

Para realizar la cuantificación de ADN, se utilizó un espectrofotómetro UV/Vis (Eppendorf Biophotometer plus). Utilizando un blanco dentro de la misma celda que las muestras para no introducir más error. Del cual se registraron datos de ADN/proteínas ng/µl (260/280) y ADN/compuestos orgánicos ng/µl (260/230).

Integridad de ADN

Para la integridad del ADN, se realizó un gel de agarosa 1%, teñido con GelRed 500x. Se cargó 1µl-3µl de muestra dependiendo de la cuantificación de cada una. (<300, 1µl) (>300, 3µl). Luego se dejó correr las muestras por 45 minutos a 90 voltios.

Realizar PCR (Marcador general)

Se elaboraron 10 tubos con máster mix para el PCR utilizando los siguientes reactivos: 16.9µl H₂O, 2.5 µl Buffer (Con 0.15 mM de MgCl₂), 1 µl dNTPs, 1.7µl Forward Primer, 1.7µl Reverse Primer, 0.2µl Taq. Posteriormente agregar a cada uno 1 µl de cada muestra de ADN, dejando dos tubos para blanco y error, respectivamente.

Para la preparación de las muestras de ADN para el análisis de PCR, se elaboró un programa para termociclaje específico para estos marcadores. Este consistió en llevar a cabo 37 ciclos cada uno con cinco pasos:

1. 94°C por 2 minutos
2. 94°C por 30 seg.
3. Tanning por 40 seg.
4. 72°C por 1 min.
5. 72°C por 10 min

Se tomaron 25µl de cada muestra para termociclar. Posteriormente se elaboró un gel de agarosa 1.5% teñido con GelRed, y se cargó 1µl-3µl de cada muestra corriendo las muestras por 45 minutos a 90 voltios.

Realización de PCR (Marcadores específicos)

Se eligieron dos marcadores específicos, MVZ 117-98 y MVZ15Bol (Palumbi, 1996). Para el marcador MVZ117 forward y 98 reverse para el marcador ARN16s (Palumbi *et al.*, 2002) se elaboraron diez tubos con máster mix (10.08µl H₂O, 1.5 µl Buffer (Con 0.15 mM de MgCl₂), 0.9 µl de MgCl₂, 0.6 µl dNTPs, 0.6 µl Forward Primer, 0.6 µl Reverse Primer y 0.12 µl Taq) para el PCR.

Para el marcador MVZ15Bol forward y Pleth16SiR1 reverse (Rovito *et al.*, 2013) para la subunidad de citocromo b, se elaboraron diez tubos con máster mix (10.98 µl H₂O, 1.5 µl Buffer (Con 0.15 mM de MgCl₂), 0.6 µl dNTPs, 0.6 µl Forward Primer, 0.6 µl Reverse Primer y 0.12 µl Taq) para el PCR. Posteriormente a cada uno se le agregó 1 µl de cada muestra de ADN., exceptuando los últimos dos tubos se utilizaron como blanco y error.

Para preparar las muestras de ADN para el análisis de PCR, se elaboró un programa para termociclaje específico para estos marcadores. Este consistió en llevar a cabo 37 ciclos cada uno con cinco pasos:

1. 94°C por 2 minutos
2. 94°C por 30 seg.
3. Tanning por 40 seg a 53°C
4. 72°C por 1 min.
5. 72°C por 10 min

Se tomaron 25µl de cada muestra para termociclar. Posteriormente se elaboró un gel de agarosa 1.5% teñido con GelRed, y se cargó 1µl-3µl de cada muestra corriendo las muestras por 45 minutos a 90 voltios.

b. Extracción de ADN con Kit DNeasy (QIAGEN, 2006)

Extracción de ADN

Se realizaron cortes de tejido de 25mg para posterior almacenaje en tubos eppendorf de 1.5. Proceder a una lisis con nitrógeno líquido agregando 180 µl de buffer ATL, homogenizando la muestra en Vortex. Se procede a la degradación de proteínas agregando 20 µl de proteinasa K, homogenizando la muestra para degradación completa con Vortex. Luego se coloca en incubación a 56°C hasta que la lisis del tejido ocurra por completo (aproximadamente 6 horas), mezclando ocasionalmente con vortex. Luego de la lisis completa se agrega 20 µl de buffer AL y 200 µl de etanol 96-100% homogenizando en vortex por 15 segundos.

Luego se transfiere el contenido del tubo (incluyendo el precipitado) con ayuda de una pipeta para la primera filtración a la mini columna DNeasy colocada en el tubo de recolección de 2ml. Centrifugar a $>6000 \times g$ (8000 rpm) por 1 minuto y descartar el sobrenadante. Para la segunda filtración se coloca un nuevo tubo de recolección en la columna y se agrega 500 μl de buffer AW1, repitiendo centrifugación y descarte, colocar nuevo tubo de recolección en la columna y agregar 500 μl de buffer AW2 y centrifugar por 3 min a $>20000 \times g$ (14000 rpm) para secar la membrana y descartar el sobrenadante. Se procede a la cuarta filtración colocando una nueva columna en el tubo de centrifugación de 1.5 y agregar 200 μl de buffer AE directamente en la membrana, proceder a incubación por un minuto a temperatura ambiente y centrifugar por 1 minuto a $>6000 \times g$ (8000 rpm) para diluir.

Cuantificación de ADN

Realizar la cuantificación con 1 μl de ADN en Nanodrop.

Realización de PCR (Marcadores específicos)

Se eligieron dos marcadores específicos con primers MVZ 117-98 y MVZ15Bol (Palumbi, 1996), para ARN16s (Palumbi *et al*, 2002) y CytB (Moritz *et al.*, 1992). Para el marcador MVZ117 forward y 98 (Palumbi, 1996), reverse para el marcador elaborando un máster mix (100.8 μl H₂O, 15 μl Buffer (Con 1.5 mM de MgCl₂), 9 μl de MgCl₂, 6 μl dNT, 6 μl Forward Primer, 6 μl Reverse Primer y 1.2 μl Taq) para el PCR.

Para el marcador MVZ15Bol forward y Pleth16SiR1 (Rovito *et al.*, 2013) reverse para el marcador de citocromo b elaboró un máster mix (109.8 μl H₂O, 15 μl Buffer (Con 1.5 mM de MgCl₂), 6 μl dNT, 6 μl Forward Primer, 6 μl Reverse Primer y 1.2 μl Taq) para el PCR. Esto se repartió en 10 tubos eppendorf de 0.5, realizando alícuotas de 24 μl . Posteriormente a cada uno se le agregó 1 μl de cada muestra de ADN., exceptuando los últimos dos tubos que fueron utilizados como blanco y error, respectivamente.

Para preparar las muestras de ADN para el análisis de PCR, se elaboró un programa para termociclaje específico para estos marcadores. Este consistió en llevar a cabo 37 ciclos cada uno con cinco pasos:

1. 94°C por 2 minutos
2. 94°C por 30 seg.
3. Tanning por 40 seg a 53°C
4. 72°C por 1 min.
5. 72°C por 10 min

Se tomaron 25 μl de cada muestra para termociclar. Posteriormente se elaboró una electroforesis en gel de agarosa 1.5% teñido con GelRed, y se cargó 1 μl -3 μl de cada muestra. Se corrieron las muestras por 45 minutos a 90 voltios.

4. Secuenciación

Para la secuenciación se enviaron las muestras a MacroGen Korea, donde el procedimiento consta el completar información sobre el experimento en las plantillas universales, adjuntadas en Anexos y enviar muestra de ADN con 30-50ng de concentración y 10 µl de muestra por reacción, en tubos rotulados apropiadamente y 10 µl de cada primer utilizado. Para garantizar una concentración adecuada se tomaron en cuenta los resultados de la electroforesis con bandas de tamaños apropiados, almacenando finalmente los productos de PCR en buffer EDTA para evitar una disolución del ADN en agua o la adhesión de este a las paredes de los tubos. Se procedió a enviarlos y se solicitó una secuenciación de tipo Sanger, que consiste en la replicación de una cadena de ADN incorporando un nucleótido sintético modificado llamado didesoxinucleótido (ddNTP) que se caracteriza por la falta de un grupo hidroxilo en su carbono 3' y de esta manera el nucleótido termina la elongación durante la replicación de ADN. La reacción se lleva a cabo con El cuatro diferentes mezclas, cada una con varias copias de la cadena de ADN que se secuenciará, también ADN polimerasa y los cebadores apropiados. Dependerá del ddNTP incorporado, el sitio donde se encontrará la adenina, guanina, citosina y timina donde se parará la elongación para que en la reacción se generen fragmentos de ADN con diferentes longitudes, la lectura la realizó una computadora que cuenta con un láser para leer la fluorescencia de los marcadores conforma a las bases que emergen o se marcan en cada uno de los carriles de la electroforesis (Solomon *et al.*, 2013)

5. Elaboración de dendrogramas

Se procede a una limpieza de las secuencias Sanger obtenidas de MacroGen Korea, con el Software Sequencher DNA 5.4.6. donde se eliminarán picos atípicos y se alinearán las secuencias a manera de obtener los ensamblajes adecuados. Se continúa descargando las secuencias de las especies semejantes (Cuadro 3) tanto del marcador ARN16s o como citocromo B, para alinearlas a la secuencia de la salamandra negra de Tzunuj en el software de Mega 7. Al tener las secuencias alineadas se hace uso de la herramienta de creación de dendrogramas de tipo UPGMA, para la generación de la historia evolutiva. Esta herramienta agrupará a las salamandras con menos variaciones alélicas dentro de sus secuencias, dando como resultado los posibles clados.

6. Generación de análisis de componentes principales y análisis de escalado multidimensional no métrico

Al obtener el clado más semejante a la salamandra negra de Tzunuj, se realizaron las mediciones morfológicas, las cuales se analizaron a manera de diferenciar dentro del clado. Los análisis estadísticos para el conocimiento de la distribución de las variables morfológicas de las

salamandras del clado *lincolni*, se realizaron con un análisis de componentes principales para el agrupamiento de las variables en elipses acorde a la semejanza de las variables. Esto se realizó en Rstudio (Version 1.2.5019) con los paquetes de “vegan”, “FactomineR”, “stats” “Factoextra” e “ISRL”. El PCA, fue luego apoyado por un análisis de escalado multidimensional no métrico para soportar la diferenciación de las variables sin omitir los factores nulos y ajustando o “escalando” los valores colapsando la información en diferentes dimensiones. Se hizo con los mismos paquetes. Script en Anexos.

7. Elaboración de árboles filogenéticos

Luego de tener los dendrogramas para la ubicación de la salamandra negra de Tzunuj dentro del clado y las mediciones respectivas, se procede a la generación de los árboles filogenéticos, para situar la distancia evolutiva de cada una de las salamandras del clado. Esto se lleva a cabo con el software de Mega 7, donde se hace uso de la herramienta de filogenia y se selecciona el método de máxima verosimilitud. Con un análisis de reconstrucción de filogenia se prueba con el método de “Bootstrap” con 500 replicaciones con modelo de sustitución de nucleótidos con patrones de Gamma distribuido en cinco categorías discretas y con el método heurístico de sustitución del vecino más cercano (Nearest-Neighbor-Interchange, NNI). Para finalmente buscar una matriz por pares estimados de máxima verosimilitud (MCL) para finalizar con la topología con un valor de probabilidad de registro superior.

8. Construcción de mapas

La elaboración de los mapas involucró dos partes, la elaboración de los mapas históricos y la generación de mapas de proyecciones, basado en variables climáticas para conocimiento de futuras áreas de migración o de distribución de las poblaciones de salamandras del grupo con el escenario de CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Esto constó de la obtención de las coordenadas de la base de datos de GBIF (Global Biodiversity Information Facility) y el registro de los datos del centro de investigaciones de reptiles y anfibios de la Universidad de Arlington, Texas, la colección de vertebrados de la Universidad del Valle de Guatemala, datos del Museo de vertebrados de la Universidad de California Berkeley y el Museo de vertebrados de la Universidad de Michigan. Estos fueron condensados en una única base de datos para luego poder ser ingresados al mapa mediante ArcGis y las proyecciones dentro de la plataforma de MAXENT.

VII. RESULTADOS

Cuadro 1. BLAST de *Bolitoglossa* sp. Nov1

Especie	Descripción	Acceso	Porcentaje de semejanza
<i>Bolitoglossa lincolni</i>	16s ARN ribosomal	MK165223.1	96.09%
<i>Bolitoglossa franklini</i>	16s ARN ribosomal	MK165224.1	95.90%
<i>Bolitoglossa lincolni</i>	16s ARN ribosomal	MK165222.1	95.90%
<i>Bolitoglossa lincolni</i>	16s ARN ribosomal	AY526148.1	95.90%
<i>Bolitoglossa franklini</i>	16s ARN ribosomal	AY526147.1	95.71%

En el Cuadro 1 presenta las cinco especies con máxima similitud a la secuencia de *Bolitoglossa* sp nov. 1 de las secuencias de las bases de datos identificadas por BLAST, con el porcentaje de semejanza que indica la coincidencia de la secuencia de interés con las bases nitrogenadas de las secuencias de comparación.

Cuadro 2. BLAST de *Bolitoglossa* sp. Nov2

Especie	Descripción	Acceso	Porcentaje de semejanza
<i>Bolitoglossa lincolni</i>	16s ARN ribosomal	MK165223.1	96.15%
<i>Bolitoglossa franklini</i>	16s ARN ribosomal	MK165224.1	95.93%
<i>Bolitoglossa lincolni</i>	16s ARN ribosomal	MK165222.1	95.93%
<i>Bolitoglossa lincolni</i>	16s ARN ribosomal	AY526148.1	95.93%
<i>Bolitoglossa franklini</i>	16s ARN ribosomal	AY526147.1	95.52%

En el Cuadro 2 presenta las cinco especies con máxima similitud a la secuencia de *Bolitoglossa* sp nov. 2 de las secuencias de las bases de datos identificadas por BLAST, con el porcentaje de semejanza que indica la coincidencia de la secuencia de interés con las bases nitrogenadas de las secuencias de comparación.

Cuadro 3. Información para especímenes de *Bolitoglossa* de GenBank y sus váuchers utilizados para los análisis filogenéticos.

Especie	Váucher	País	ARN16s	CytB
<i>Bolitoglossa carri</i>	USNM 523276	Honduras	AY526138	AY526175
<i>Bolitoglossa cataguana</i>	UF 51786	Honduras	KJ628089	KJ628090
<i>Bolitoglossa celaque</i>	SMF 78087	Honduras	AY526140	AY526177
<i>Bolitoglossa conanti</i>	MVZ 257800	Guatemala	GU725445	GU725458
<i>Bolitoglossa cuchumatana</i>	MVZ 252541	Guatemala	GU725454	GU725467
<i>Bolitoglossa decora</i>	USNM 497533	Honduras	AY526143	AY526180
<i>Bolitoglossa diaphora</i>	MVZ 263440	Honduras	GU725447	GU725460
<i>Bolitoglossa dunni</i>	MVZ 263454	Honduras	GU725446	GU725459
<i>Bolitoglossa engelharti</i>	MVZ 251495	Guatemala	GU725448	GU725461
<i>Bolitoglossa eremia</i>	UTA A-58429	Guatemala	-	HQ009992
<i>Bolitoglossa flavimembris</i>	MVZ 177786	México	GU725449	GU725462
<i>Bolitoglossa franklini</i>	MVZ 185991	México	AY526147	AY526184
<i>Bolitoglossa franklini</i>	UTA A-58687	Guatemala	-	HQ010016
<i>Bolitoglossa heriroreias</i>	MVZ 233028	El Salvador	AY526154	AY526191
<i>Bolitoglossa helmrichi</i>	MVZ 257804	Guatemala	GU725450	GU725463
<i>Bolitoglossa kaqchikelorum</i>	UTA A-58565	Guatemala	-	HQ010020
<i>Bolitoglossa lincolni</i>	MVZ 263475	Guatemala	GU725451	GU725464
<i>Bolitoglossa longissima</i>	USNM 523285	Honduras	AY526149	AY526186
<i>Bolitoglossa meliana</i>	MVZ 265621	Guatemala	KJ175100	KJ175105
<i>Bolitoglossa mexicana</i>	MVZ 176838	México	GU725457	GU725470
<i>Bolitoglossa morio</i>	MVZ 257825	Guatemala	GU725452	GU725465
<i>Bolitoglossa morio</i>	MVZ 251466	Guatemala	KJ175098	KJ175106
<i>Bolitoglossa oresbia</i>	USNM 579667	Honduras	KJ175098	KJ175106
<i>Bolitoglossa porrasorum</i>	MVZ 225852	Honduras	AY526151	AY526193
<i>Bolitoglossa rostrata</i>	MVZ 263517	Guatemala	GU725453	GU725466
<i>Bolitoglossa rostrata</i>	MVZ 251521	Guatemala	KJ175099	KJ175107
<i>Bolitoglossa suchitanensis</i>	UTA A-58422	Guatemala	-	HQ010001
<i>Bolitoglossa synoria</i>	SMF 78084	Honduras	AY526156	AY526193
<i>Bolitoglossa tenebrosa</i>	MVZ 264289	Guatemala	KJ175103	KJ175110

Especie	Váucher	País	ARN16s	CytB
<i>Bolitoglossa tenebrosa</i>	MVZ 265504	Guatemala	KJ175102	KJ175109
<i>Bolitoglossa tenebrosa</i>	MVZ 169038	Guatemala	KJ175104	-
<i>Bolitoglossa tenebrosa</i>	UTA A-58565	Guatemala	-	HG010004
<i>Bolitoglossa zacapensis</i>	MVZ 257803	Guatemala	GU725455	GU725468
<i>Bolitoglossa zacapensis</i>	MVZ 257805	Guatemala	GU725456	GU725469

El Cuadro 3 presenta las especies utilizadas para el análisis filogenético con su código de acceso de GenBank para los genes ARN16s y CytB. Los números de acceso de GenBank son de Parra-Olea *et al.* (2004), Rovito y Vázquez-Almazán (2010), Vázquez-Almazán y Rovito (2014) y Campbell *et al.* (2010).

Cuadro 4. Tamaño de la muestra

	Toma de medidas	Coordenadas de distribución	Secuencias ARN16s	Secuencias CytB
<i>Bolitoglossa lincolni</i>	30	782	1	6
<i>Bolitoglossa franklini</i>	13	3031	1	2
<i>Bolitoglossa meliana</i>	30	215	1	1
<i>Bolitoglossa</i> sp. Nov.	3	26	2	2

El tamaño de las muestras para cada metodología se encuentra resumido en el Cuadro 4, presentando la cantidad de individuos con los que se contaba para cada procedimiento. Para la toma de medidas, la mayoría de los individuos fueron adquiridos del Centro de Investigaciones de anfibios y reptiles de la Universidad de Texas, Arlington; luego las coordenadas, se tomaron en cuenta de la plataforma GBIF y del museo de UTA, el museo de la Universidad de Berkeley California y de la Universidad de Michigan. Finalmente, la cantidad de secuencias obtenidas de la plataforma de GenBank para la comparación filogenética.

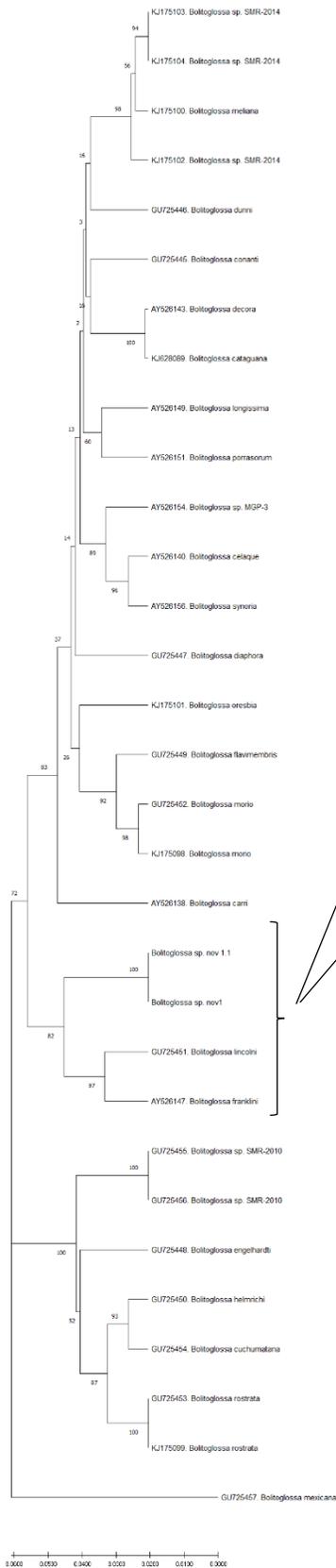


Figura 12. Relaciones evolutivas de taxones según el fragmento ARN16s

La historia evolutiva se infiere utilizando el método UPGMA (Sneath, 1973). Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 0.51253969. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon con

500 repeticiones (Felsenstein, 1985). Las longitudes de cada rama se encuentran en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de la distancia p (Nei, 2000) y están en las unidades del número de diferencias de base por sitio. Este análisis incluyó 31 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones ambiguas para cada par de secuencias. Hubo un total de 508 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X (Kumar, 2016).

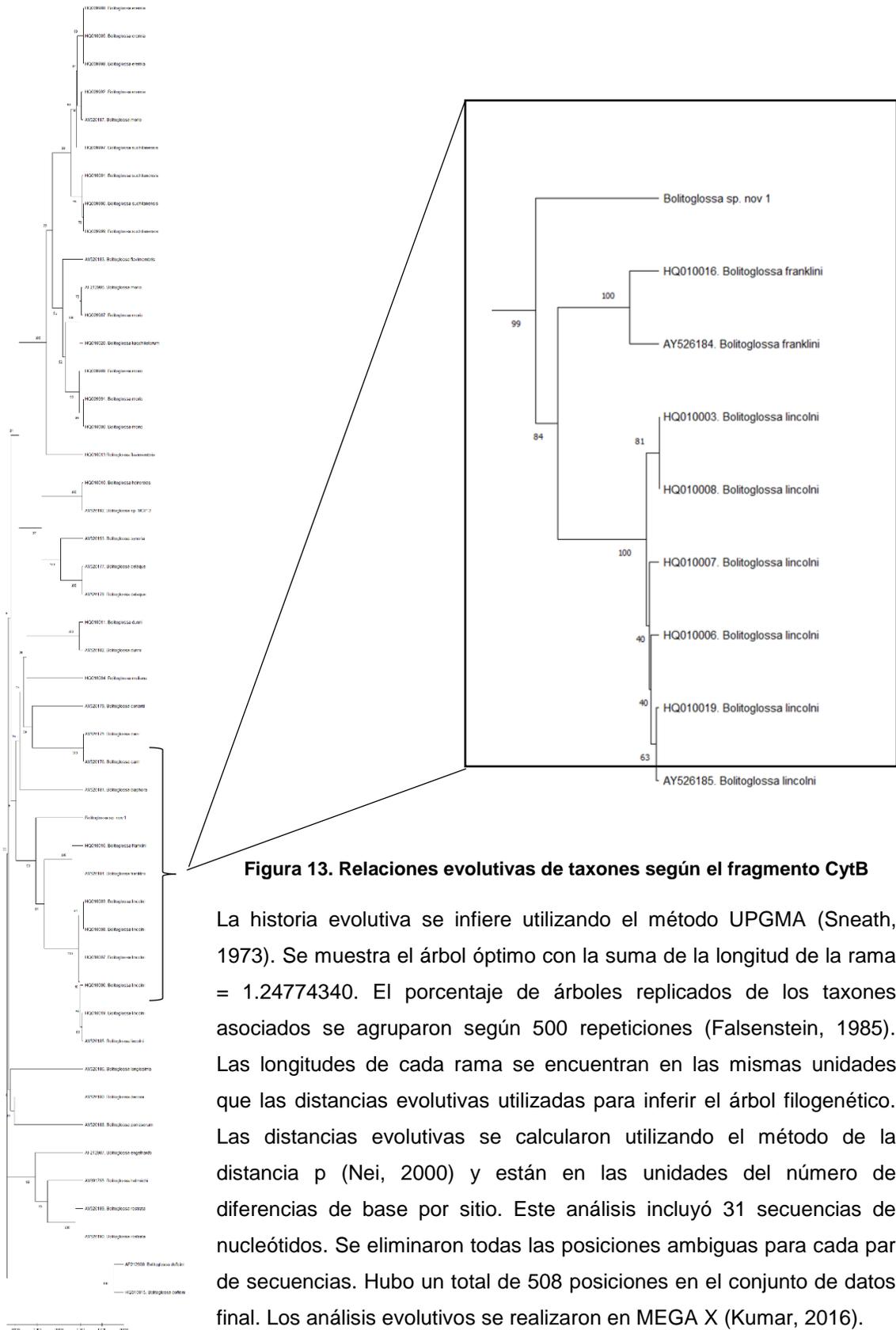


Figura 13. Relaciones evolutivas de taxones según el fragmento CytB

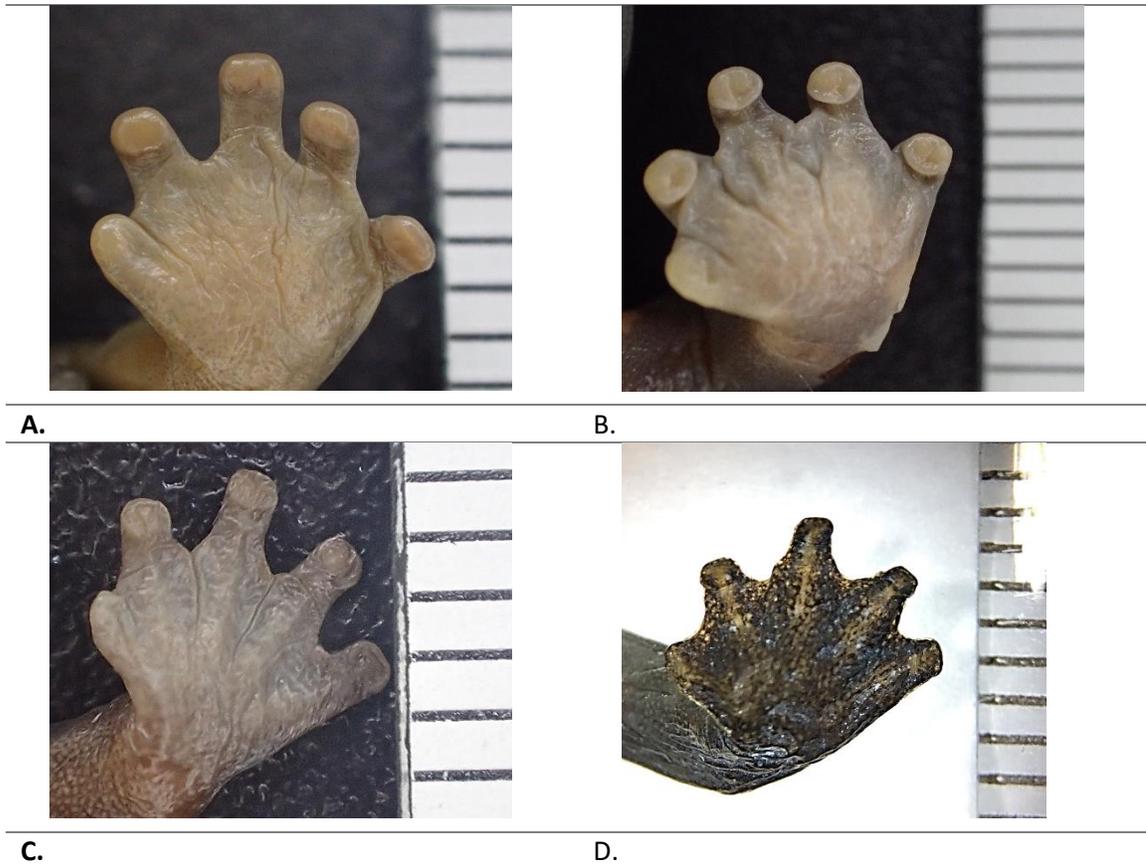
La historia evolutiva se infiere utilizando el método UPGMA (Sneath, 1973). Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 1.24774340. El porcentaje de árboles replicados de los taxones asociados se agruparon según 500 repeticiones (Felsenstein, 1985). Las longitudes de cada rama se encuentran en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de la distancia p (Nei, 2000) y están en las unidades del número de diferencias de base por sitio. Este análisis incluyó 31 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones ambiguas para cada par de secuencias. Hubo un total de 508 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X (Kumar, 2016).

Cuadro 5. Comparación de patas delanteras derechas de salamandras del clado *lincolni*



En el Cuadro 4 se presentan fotografías de las patas delanteras derechas de las tres salamandras pertenecientes al clado *lincolni* (Wake y Lynch, 1976) y la salamandra negra de Tzunuj. Donde **A.** Pata delantera de *Bolitoglossa franklini* A-48520, **B.** Pata delantera de *Bolitoglossa lincolni* A-51447, **C.** Pata delantera de *Bolitoglossa meliana* A-38609 y **D.** Pata delantera de *Bolitoglossa* sp. Nov.

Cuadro 6. Comparación de patas traseras derechas de salamandras del clado *lincolni*



En el Cuadro 5 se presentan fotografías de las patas traseras derechas de las tres salamandras pertenecientes al clado *lincolni* (Wake y Lynch, 1976) y la salamandra negra de Tzunuj. Donde **A.** Pata trasera de *Bolitoglossa franklini* A-18233, **B.** Pata trasera de *Bolitoglossa lincolni* A-51447, **C.** Pata trasera de *Bolitoglossa meliana* A-58565 y **D.** Pata trasera de *Bolitoglossa* sp. Nov.

Cuadro 7. Comparación vista ventral de cabeza y sección gular de salamandras del clado *lincolni*



En el Cuadro 7 se presentan fotografías de la vista ventral de cabeza y sección gular de las tres salamandras pertenecientes al clado *lincolni* (Wake y Lynch, 1976) y la salamandra negra de Tzunuj. Donde **A.** Vista ventral de cabeza y sección gular de *Bolitoglossa franklini* A-18233, **B.** Vista ventral de cabeza y sección gular de *Bolitoglossa lincolni* A-51499, **C.** Vista ventral de cabeza y sección gular de *Bolitoglossa meliana* A-58565 y **D.** Vista ventral de cabeza y sección gular de *Bolitoglossa* sp. Nov.

Cuadro 8. Análisis de componentes principales de *Bolitoglossa meliana*, *Bolitoglossa franklini*, *Bolitoglossa lincolni* y *Bolitoglossa* sp. Nov.

	PC1	PC2	PC3	PC4
Desviación estándar	32.0572	13.0119	7.19102	4.20764
0.43930				
Proporción de varianza	0.8061	0.1328	0.04056	0.01389
0.00015				
Proporción Cumulativa	0.8061	0.9389	0.97945	0.99334
0.99925				

El análisis de componentes principales consta del ajuste de las variables medidas en dirección en la varianza mayor, llevándolas a la misma escala elevada al cuadrado. Por ende, se obtienen veinticinco PCA ajustados que explican a distintos niveles como agrupan las variables. El Cuadro 7 explica la diferenciación de las variables con una proporción >70% para el ajuste con PC1 y el PC2.

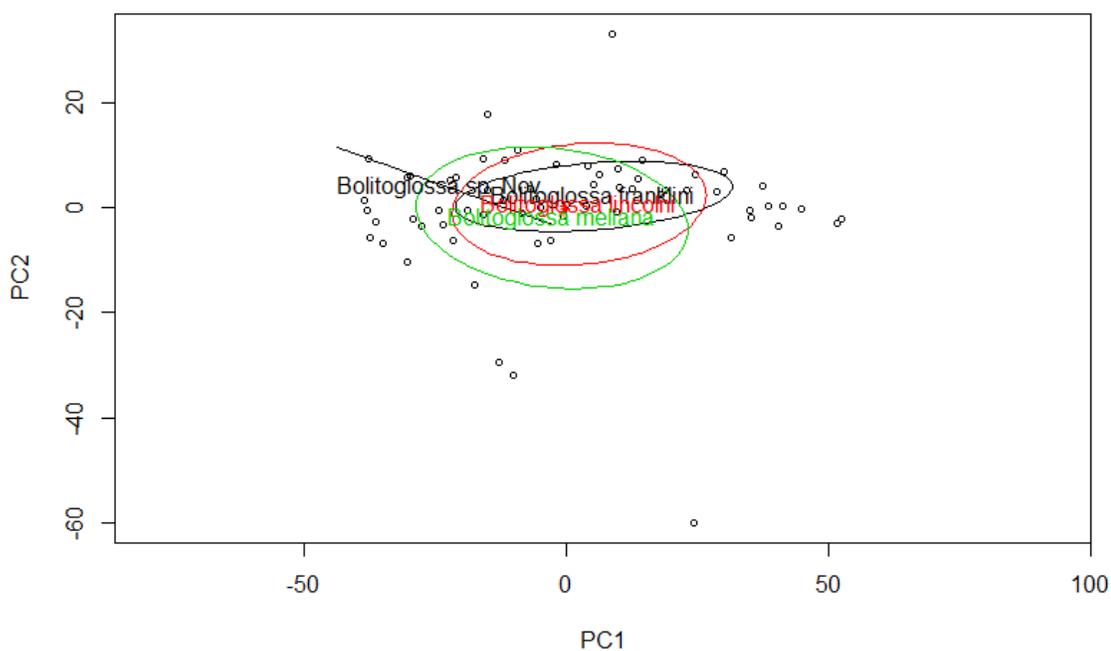


Figura 13. Análisis de componentes principales (PCA)

La Figura 13 presenta las veinticinco medidas de las salamandras agrupadas por especies, las elipses del PCA agrupan todas las variables, limitando una diferenciación, exceptuando *Bolitoglossa* sp. Nov. Que se encuentra un poco más alejada de las demás.

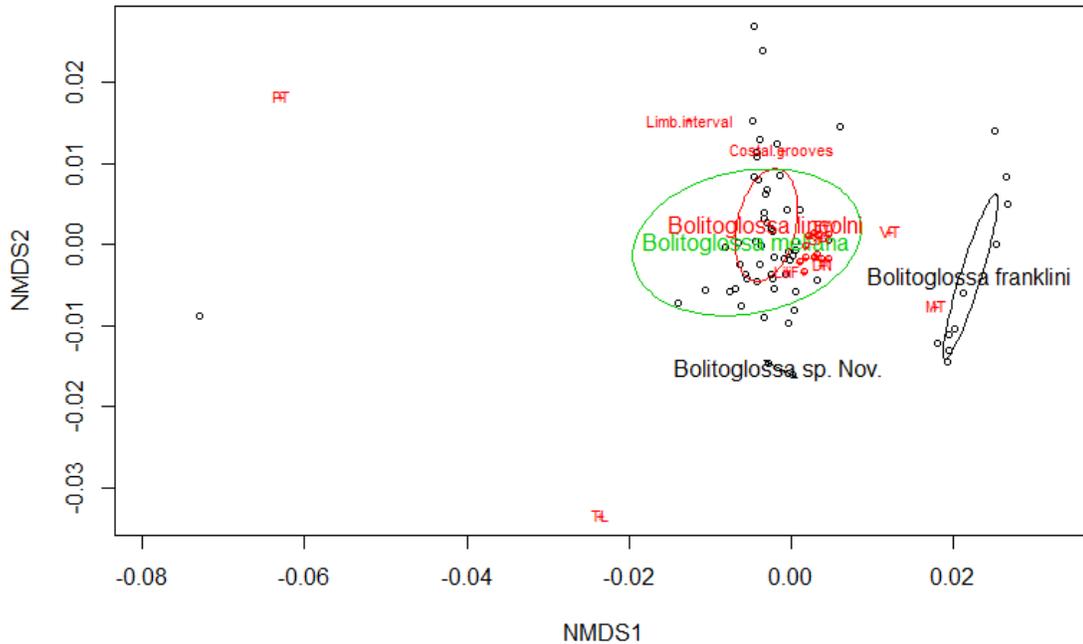


Figura 14. Análisis de escalado multidimensional no métrico (NMDS)

Se realiza un NMDS con el fin de diferenciar más las variables entre las especies ya que, el escalado multidimensional, permite colapsar información en múltiples dimensiones en solo unas pocas, para que puedan ser visualizadas e interpretadas de mejor manera. El NMDS hace uno de órdenes de rango y por lo tanto es más flexible para el tipo de datos, que son las medidas de la salamandra. En la Figura 13 el NMDS indica que *Bolitoglossa lincolni* y *Bolitoglossa meliana* cuentan con características morfológicas poco diferenciables, mientras que *Bolitoglossa franklini* varía de estas por los dientes vomerianos y *Bolitoglossa sp. Nov.*, por más variables separándose por casi -0.02, diferenciándose en cantidad de dientes premaxilares, dientes vomerianos, maxilares y tamaños de cola.

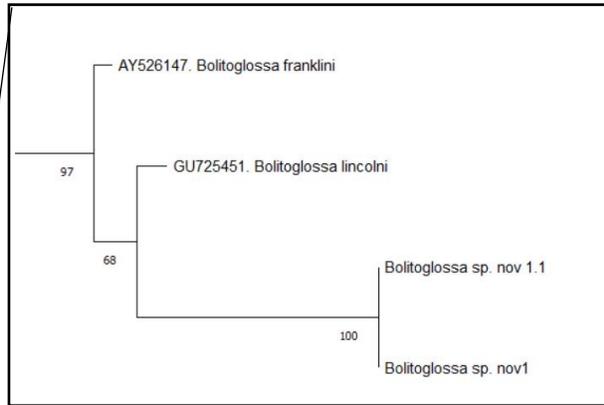
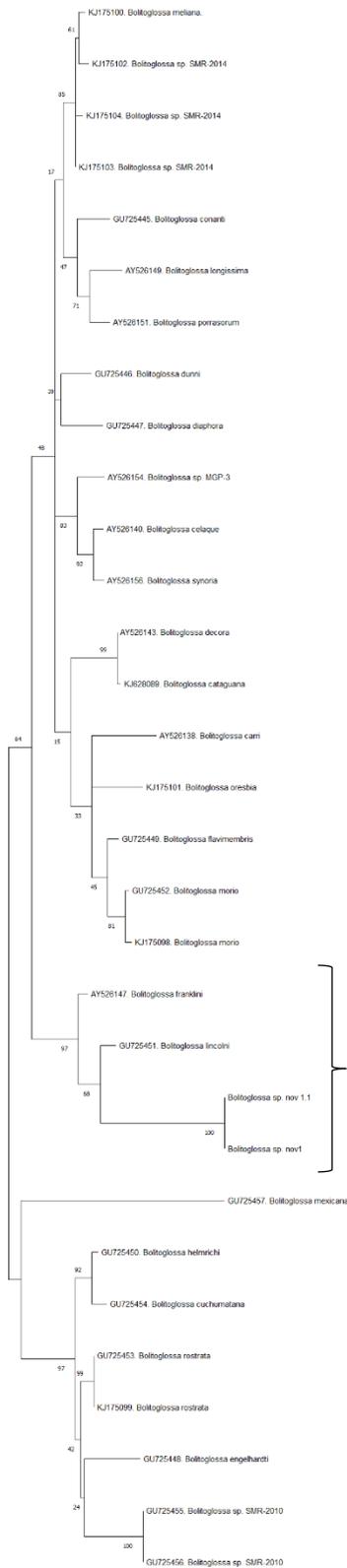


Figura 15. Análisis evolutivo por método de máxima verosimilitud para gen ARN16s

La historia evolutiva se infirió utilizando el método de máxima verosimilitud y el modelo Tamura-Nei (1993). Se muestra el árbol con la mayor probabilidad de registro (-2265.81). El porcentaje de asociación de árboles en que los taxones se agrupan se muestra junto a las ramas. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos de unión de vecinos y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el enfoque de máxima verosimilitud compuesta (MCL), y luego seleccionando la topología con un valor de probabilidad de registro superior. Se utilizó una distribución Gamma discreta para modelar las diferencias de velocidad evolutiva entre los sitios (5 categorías (+ G, parámetro = 0.1901)). Este análisis incluyó 31 secuencias de nucleótidos. Hubo un total de 508 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X (Kumar, 2018).

*

Bolitoglossa meliana

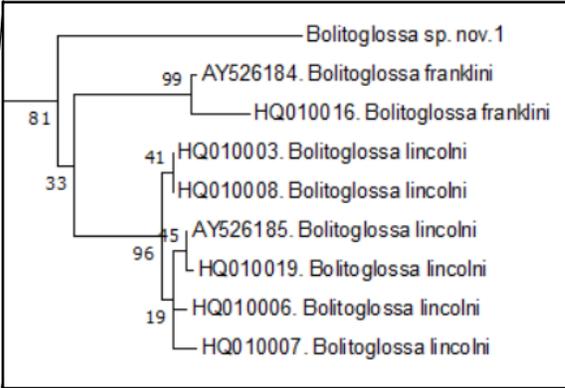
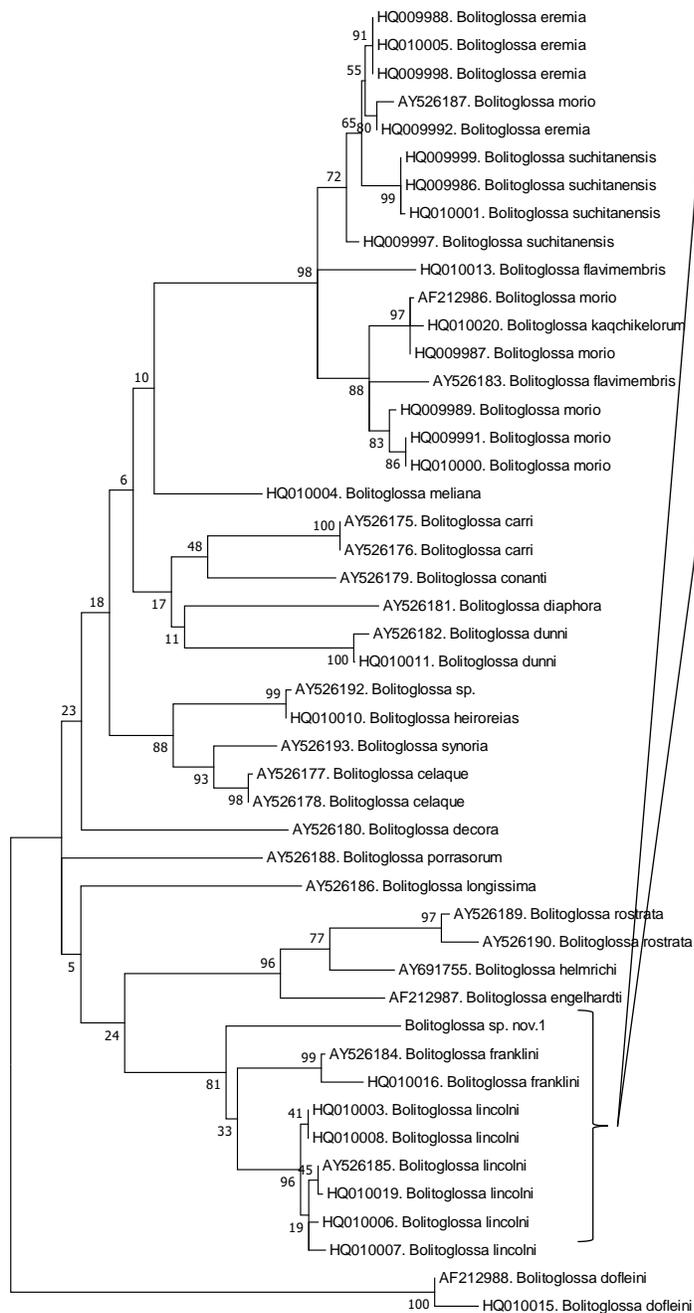


Figura 16. Análisis filogenético molecular por método de máxima verosimilitud para gen CytB

La historia evolutiva se infirió utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993). Se muestra el árbol con la mayor probabilidad de registro (-15634.65). Se presenta el porcentaje de asociación de taxones junto a las ramas. Se aplicaron los algoritmos de unión de vecinos y Bio NJ para búsqueda heurística a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el enfoque de máxima verosimilitud compuesta (MCL), y luego seleccionando la topología con un valor de probabilidad de registro superior. Se utilizó una distribución Gamma discreta para modelar las diferencias de velocidad evolutiva entre los sitios (5 categorías (+ G, parámetro = 0.3192)). El análisis incluyó 47 secuencias de

nucleótidos. Hubo un total de 563 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016).

* *Bolitoglossa meliana*

Proyección de distribución de subgrupo *lincolni* con variables climáticas de precipitación, elevación y temperatura actuales

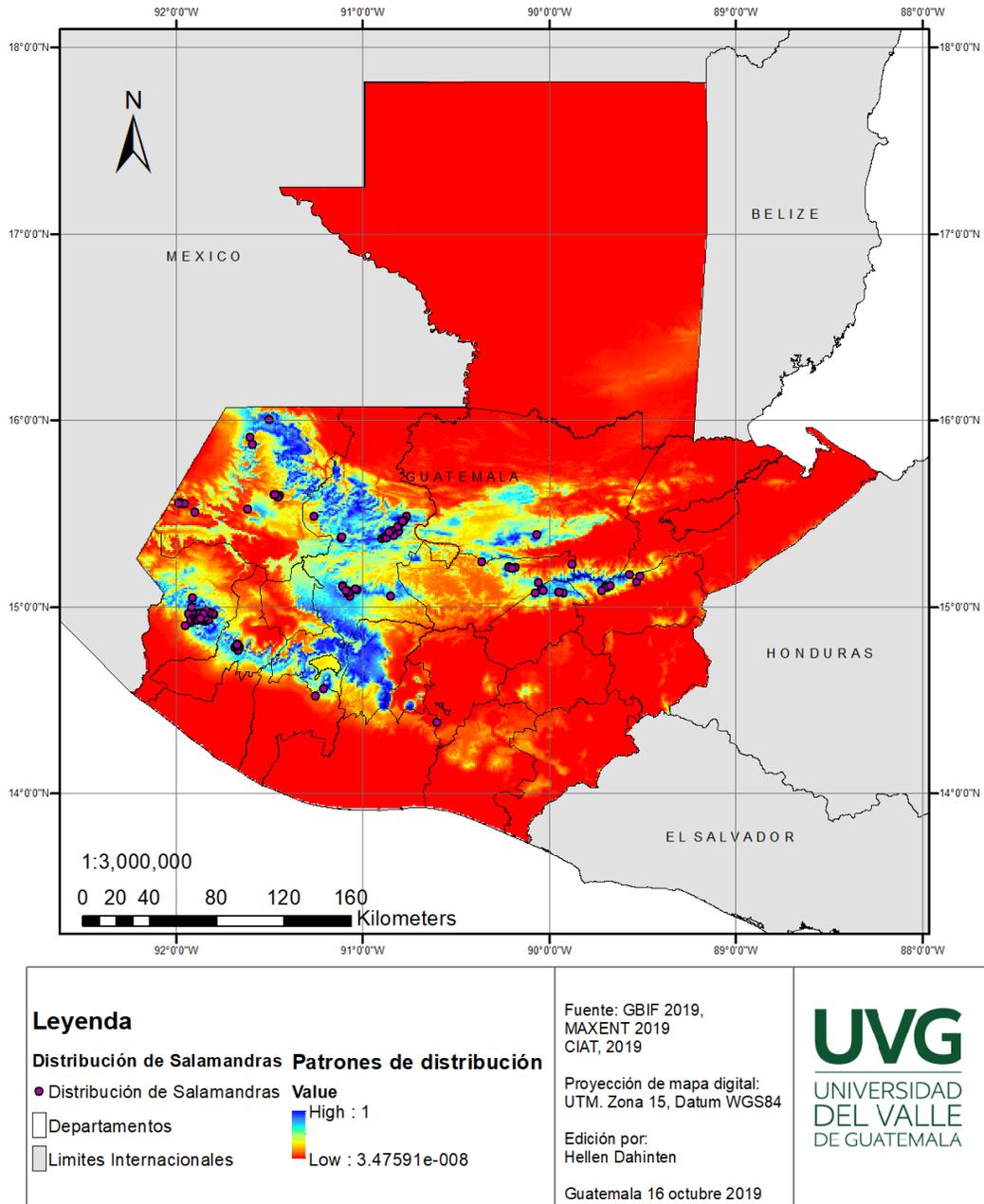


Figura 17. Mapa de patrones de distribución del subgrupo *lincolni* con variables climáticas del año 2019

Proyección de distribución de subgrupo *lincolni* con variables climáticas de precipitación, elevación y temperatura del Holoceno

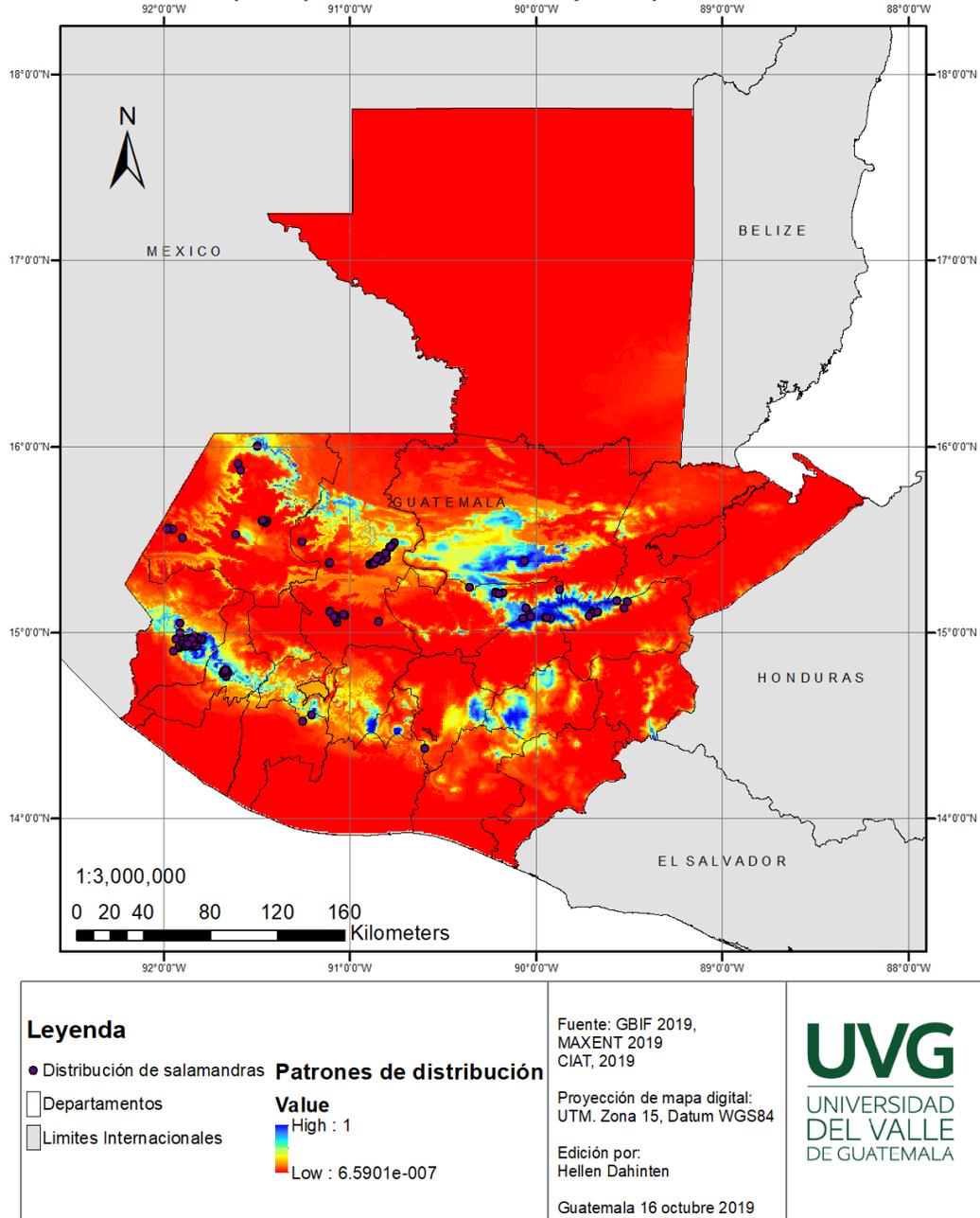


Figura 18. Mapa de patrones de distribución del subgrupo *lincolni* con variables climáticas del Holoceno

Proyección de distribución de salamandras con variables climáticas de precipitación, elevación y temperatura para el 2030

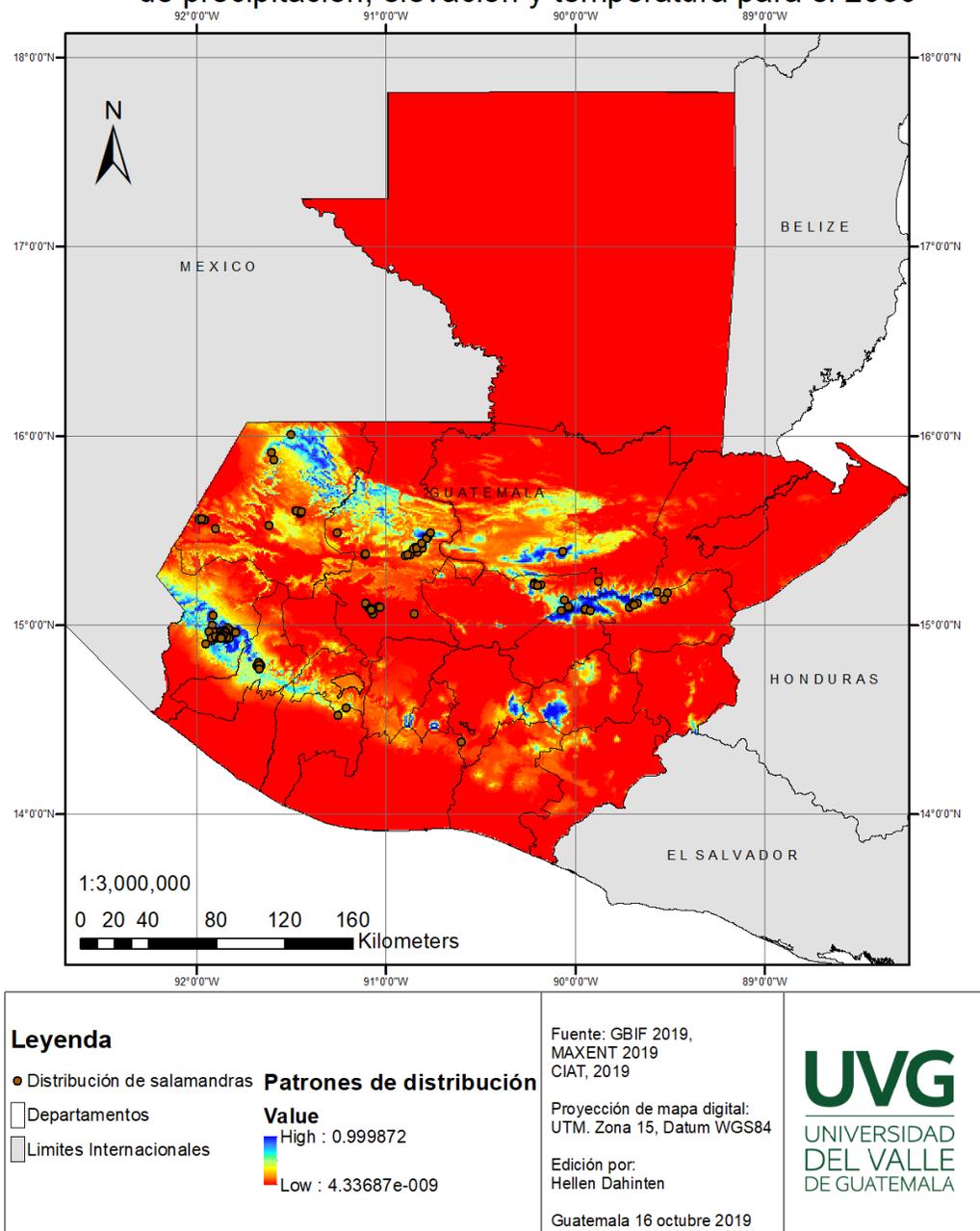


Figura 19. Mapa de patrones de distribución del subgrupo *lincolni* con variables climáticas para el año 2030

Proyección de distribución de subgrupo *lincolni* con variables climáticas de precipitación, elevación y temperatura para el 2050

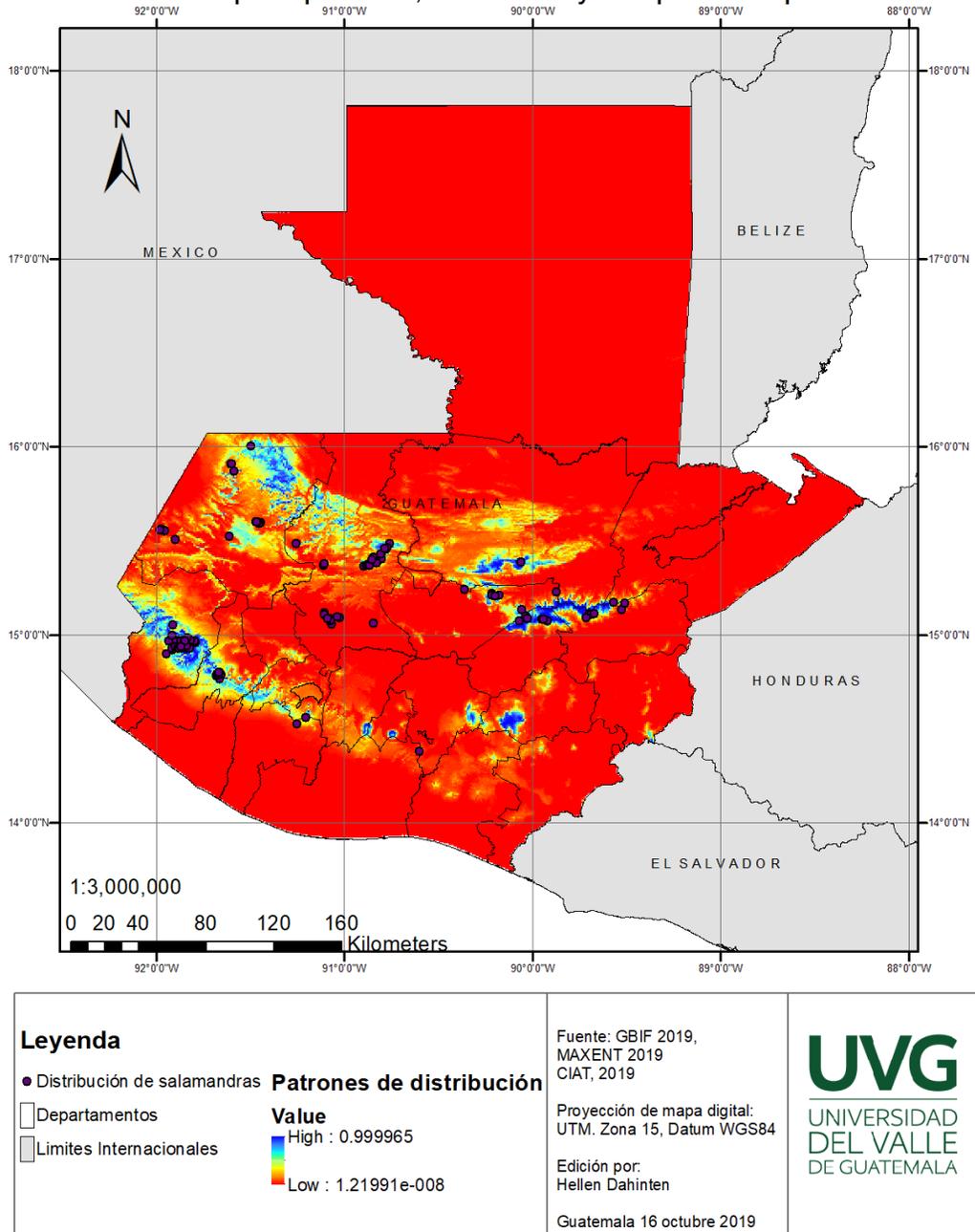


Figura 20. Mapa de patrones de distribución del subgrupo *lincolni* con variables climáticas para el año 2050

Proyección de distribución de subgrupo *lincolni* con variables climáticas de precipitación, elevación y temperatura para el 2070

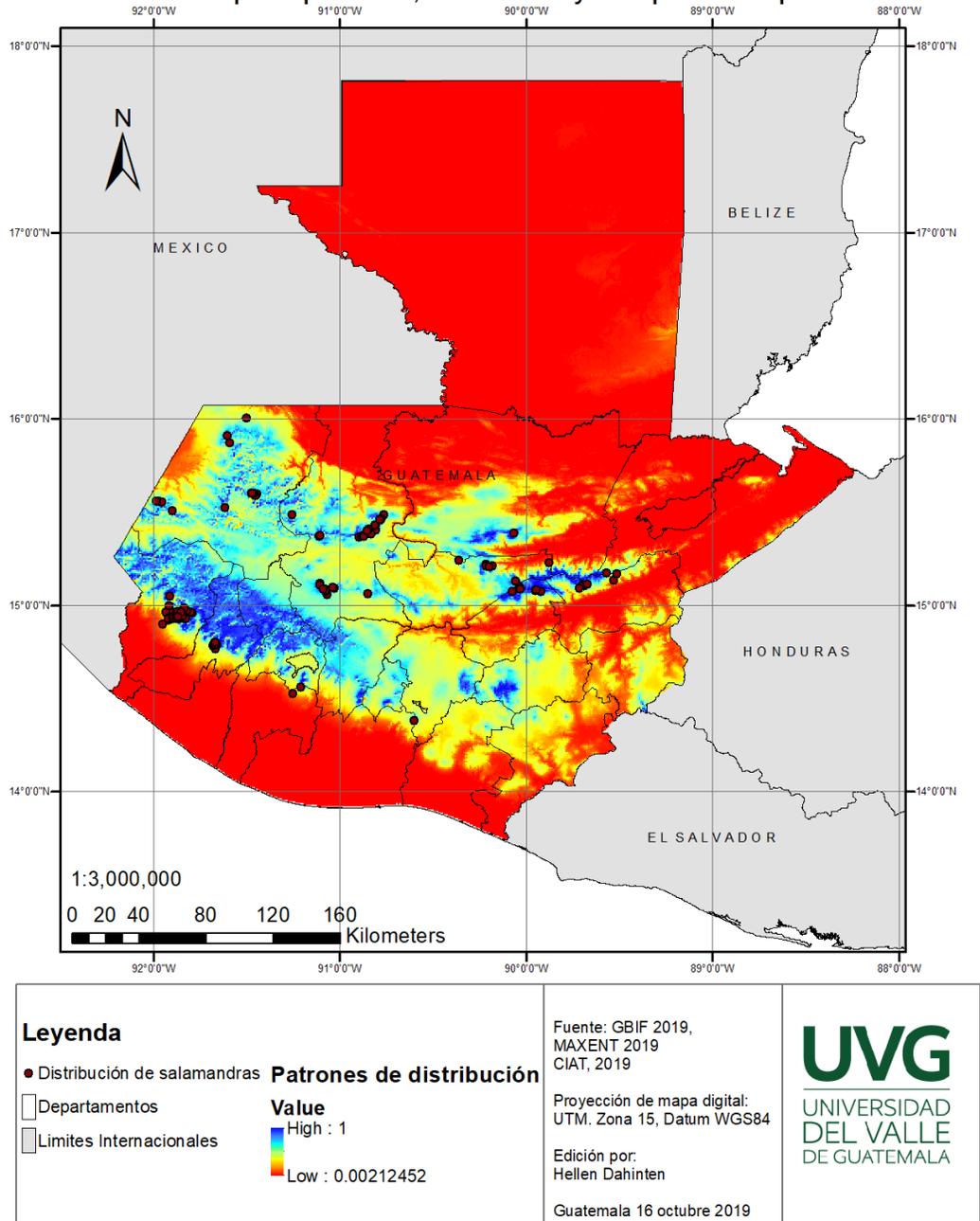


Figura 21. Mapa de patrones de distribución del subgrupo *lincolni* con variables climáticas para el año 2070

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La hipótesis planteada sobre que el aislamiento filogeográfico propicia la presencia de una especie nueva de salamandra del subgénero *Magnadigita* en el clado del subgrupo *lincolni*, fue probada mediante un análisis genético del clado de salamandras evaluando dos genes, el ARN16s y el citocromo b; un análisis morfológico con medición de veinticinco variables de 4 especies y un análisis filogeográfico para ver patrones de aislamiento y distribución histórica. Para cumplir con el fin último de explicar la variación de características morfométricas de la población de salamandras negras presentes en la finca Tzunuj, San Cristóbal, Alta Verapaz y la recopilación de patrones históricos de aislamiento de las salamandras del clado *lincolni*.

A. Comparación y revisión taxonómica

Los especímenes de salamandra del género *Bolitoglossa* del área de San Cristóbal, Alta Verapaz diferían de los especímenes de las localidades más cercanas. A pesar de que la especie no fue descubierta hasta 2018, la existencia de más especies de *Bolitoglossa* (*Magnadigita*) en la Sierra Chuacús fue anticipada por Stuart (1943). Se descartó la coincidencia con las poblaciones de salamandras simpátricas por una rápida comparación y fácil diferenciación, ya que en Tzunuj se encuentran, *Bolitoglossa helmrichi*, *Cryptotriton veraepacis* y *Nyctanolis pernix* (Ramírez, 1998; Pineda-Schwarz *et al.*, 2018). Al analizar la coloración, se observó que las posibles salamandras cercanas fueran *Bolitoglossa meliana* y *Bolitoglossa tenebrosa*, por ser negras y de un tamaño considerablemente grande (SVL: 50-70cm). Aparte de los patrones de distribución, que es totalmente posible que el bosque nuboso que cubre toda la Sierra Chuacús y de las Minas encajara con este esquema (grupo de especies *Bolitoglossa meliana*, *Bolitoglossa lincolni* y *Bolitoglossa tenebrosa*).

B. Análisis genético

Con los resultados de la variación de la coloración se procedió a un análisis genético para la localización de la salamandra dentro de la filogenia. Se evaluaron dos genes mitocondriales ARN16s y Citocromo B. Se hace uso del gen ARN16s por ser altamente conservado, teniendo bajas tasas de evolución, lo que permite fácilmente hacer una reconstrucción de una filogenia, a cambio el gen de citocromo B ayuda para la determinación de las relaciones filogenéticas entre organismos sobre la base de la variabilidad de su secuencia (Woose y Fox, 1997; Guo *et al.*, 2012); siendo ambos muy buenos candidatos para la identificación de una nueva especie por tener la distribución y variabilidad adecuada para poder ser utilizados como marcadores (Koonin, 2003). Los resultados del análisis genético sitúan a la nueva salamandra negra muy relacionada al clado del grupo *lincolni* cumpliendo con el mayor porcentaje de semejanza del BLAST (Cuadros 1 y 2) para el gen ARN16s luego de la determinación de la distancia filogénica por

comparación de genomas, que consta de una comparación global mediante alineamiento local (Chun y Rainey, 2014). Esto indica que la salamandra negra de Tzunuj pertenece al grupo o es un taxón hermano de *Bolitoglossa lincolni*, *Bolitoglossa franklini* y *Bolitoglossa meliana* (Wake, 1982). Por ende, es necesario construir dendrogramas y árboles filogenéticos, que indica el acoplamiento al clado por el porcentaje de semejanza de >95% lo cual, diferencia lo suficiente las secuencias para explicar las variaciones morfológicas y descartar que pertenezca a una especie ya existente (Kim *et al.*, 2014). Esto es resultado de la diferenciación alélica, porque al tener un porcentaje mayor al 92% se evidencia que la variación de la secuencia no se debe únicamente a un evento aislado, sino a una mutación recurrente que será dada en las generaciones.

C. Construcción de dendrogramas

Por ende, con los porcentajes de semejanza se procedió a la construcción de un dendrograma para confirmar la pertenencia de la salamandra negra de Tzunuj al clado. Esta se infiere utilizando el método de UPGMA (Sneath, 1973), ideal para la construcción de árboles filogenéticos cuando las tasas de evolución son aproximadamente constantes entre los distintos linajes. El propósito del método es hacer uso del número de sustituciones observadas de nucleótidos o aminoácidos, empleando un algoritmo de agrupamiento secuencial que ordena de manera gradual las relaciones topológicas. Inicialmente se evalúan las unidades taxonómicas operativas (OTU), es decir los nódulos terminales de los que se deriva el árbol (Weiß y Göker, 2011). Lo primero es evaluar las OTU más similares y luego se van tratando como únicas hasta derivar por completo las secuencias de las especies evaluadas (Cuadro 3). Con esto se obtienen los dos dendrogramas, para el gen ARN16s (Figura 12) se muestra una suma de la longitud de rama de 0.51253969, mientras que para citocromo B (Figura 13) la longitud de la rama es de 1.24774340, lo que indica el tiempo evolutivo de separación. Estas relaciones filogenéticas permiten identificar con que especies comparar, sin embargo, no explican la filogenia ni la historia evolutiva ya que, es únicamente un ordenamiento por semejanza de las secuencias, lo que más adelante se busca explicar con medición de las variantes morfológicas y con árboles filogenéticos.

D. Medición y evaluación de variables morfológicas

En este estudio, se midieron veinticinco variables morfológicas de las salamandras pertenecientes al subgrupo *lincolni* según Wake y Lynch (1976). Por la ausencia de normalidad de los datos, se realizó un análisis de componentes principales (PCA), una prueba multivariada que consta de un ajuste de las variables en dirección a la varianza mayor para tenerlas a todas en la misma escala (Head, 2007). El análisis de componentes principales basado en los residuos de todas las variables es explicado por el PC1 y PC2 (Cuadro 7), indicando que el ajuste a la

primera y segunda variable explican la variación para las cuatro especies del clado, incluyendo la no descrita de *Bolitoglossa* (Figura 13). Sin embargo, existe la limitante de valores nulos dentro del PCA, porque no puede ajustar los valores a estas variables y por lo tanto aglomera el resto de los datos presentando que no existe una variación significativa entre las especies (Figura 13) a pesar del alto porcentaje de varianza. Esto lleva a un análisis donde la distancia, no sea afectada por los valores nulos, por lo que se elige un análisis de escalado multidimensional no métrico (NMDS) porque, puede elegir cualquier matriz de similitud. En el NMDS (Figura 14) se tienen las variables condensadas, con los órdenes de rango, es decir con una direccionalidad hacia la variable con mayor diferenciación. Por ende, puede interpretarse que la diferenciación de las especies del clado se atribuye a las variables de dientes maxilares (MT), dientes vomerianos (VT), largo de la cola (TL) y dientes premaxilares (PT) y algunas que pueden dar información son la cantidad de surcos intercostales (Costal grooves) y la cantidad de surcos entre patas (limb Interval). El NMDS 1 se correlaciona positivamente con los conteos de dientes premaxilares, cantidad de surcos entre patas y cantidad de surcos intercostales; a diferencia de la correlación negativa con el tamaño de las colas (-0.03) y cantidad de dientes maxilares (-0.01) que indica la mayor diferenciación entre la especie de *Bolitoglossa* no descrita. Los individuos de *B. meliana* y *B. lincolni*, presentan los valores menos variados de NMDS1 y NMDS2, lo que indica que las morfometrías no varían mucho, siendo las dos especies más semejantes morfológicamente del clado. Los valores negativos en el NMDS2 de *Bolitoglossa* sp. Nov. evidencian que tienen colas de menor tamaño y una menor cantidad de dientes maxilares, en comparación a *B. meliana* y a *B. lincolni*. A cambio de *Bolitoglossa franklini* presenta una mayor cantidad de dientes maxilares por el valor positivo de NMDS1 y mayor cantidad de dientes vomerianos en comparación a las otras tres especies.

En cuanto a variables de tamaño de las patas y largos de los dedos no se presenta mayor variación para las cuatro especies, sin embargo, por observación, las variaciones que estas presentan no pueden ser medidas y se muestran en imágenes, para las patas delanteras (Cuadro 4) se observa una palma con mayor tejido para *Bolitoglossa franklini* y *B. lincolni*, dedos redondeados para *B. meliana*, *B. franklini* y *B. lincolni*, dejando a un lado las características de la salamandra negra de Tzunuj de tener poco tejido y puntas de los dedos completamente chatos (Cuadro 4. D.). Esta variación se presenta también en las patas traseras (Cuadro 5.) donde la pata de *Bolitoglossa* sp. Nov. Presenta puntas de dedos completamente chatos y mínimo tejido en la planta. Se hipotetiza que la variación en la cantidad de tejido de la pata se atribuya al hábitat donde se desarrollan, presentando para la salamandra negra de Tzunuj, predominancia en helechos a una altura aproximada de un metro, mientras que las demás suelen tener hábitats más altos por lo que necesitarían una mayor adhesión a los sustratos, requiriendo de mayor tejido para mejor agarre (Rovito y Vázquez-Almazán, 2010; Vázquez-Almazán y Rovito, 2014; Wake, 1982). Una variación evidente a observación es la forma de las cabezas (Cuadro 6.),

revelando la trompa chata de la salamandra negra de Tzunuj tanto en machos como hembras, en comparación a las trompas de *Bolitoglossa meliana*, *Bolitoglossa franklini* y *Bolitoglossa lincolni* que presentan trompas totalmente redondeadas. Esta característica puede ser atribuida a patrones de alimentación o al comportamiento sexual de la especie, que requiere de una investigación más profunda.

E. Generación de árboles filogenéticos

Con las características morfológicas evaluadas, se procede a analizar las secuencias para generar un árbol filogenético *per se*, que pueda establecer la historia evolutiva de las salamandras del grupo *lincolni*. Se generó un árbol para cada gen evaluado ARN16s y citocromo B, con el método de máxima verosimilitud y el modelo de Tamura-Nei (1993). Con esto se busca identificar la topología que exprese con mayor probabilidad los cambios en los nucleótidos que se observan en las secuencias analizadas (OTU's). Ambos árboles se realizaron con 500 replicaciones. Para el árbol del gen ARN16s comparado a 31 secuencias de especies de salamandras pertenecientes al grupo *Magnadigita* (Figura 26) se puede inferir que la salamandra negra de Tzunuj si pertenece al clado del grupo *lincolni* teniendo una distancia de porcentaje de asociación de 100, luego de las 500 repeticiones, pero con la suficiente confianza para indicar una total variación tanto a *Bolitoglossa lincolni* y *Bolitoglossa franklini* reafirmando la información que provee el dendrograma y las variantes morfológicas. Sin embargo, la secuenciación varía con la sugerencia de Wake y Lynch (1976), sobre la pertenencia de *Bolitoglossa meliana* relacionándola mayormente con la salamandra *Bolitoglossa tenebrosa* K J175104.

Para la evaluación filogenética del gen mitocondrial citocromo B (Figura 16), se realiza un árbol con el mismo procedimiento y modelo del árbol filogenético del ARN16s, sin embargo, para este existe una mayor cantidad de secuencias de especies del grupo *Magnadigita* lo que permite comparar la secuencia de *Bolitoglossa* sp. Nov, con 47 diferentes secuencias. Con este gen se tiene la característica de dar información de la sustitución de nucleótidos que se causa por evolución y tiende a tener un mejor criterio de discriminación entre vertebrados estrechamente relacionados (Guo *et al.*, 2012) y al tener más especímenes secuenciados del clado, se puede dar una mejor conclusión al respecto de la historia evolutiva de la salamandra negra de Tzunuj. Entonces se infiere que la agrupación y los niveles de confianza para el gen de citocromo B son más concretos y estos indican que *Bolitoglossa* sp. Nov. se encuentra altamente diferenciada de las demás especies del clado. Aparte se localiza en el nodo de separación del clado con un 33% de asociación, indicando que podría ser el ancestro de *Bolitoglossa lincolni* y *Bolitoglossa franklini*. El árbol para el gen CytB, presenta la misma diferenciación para *Bolitoglossa meliana* y la separa totalmente del clado a pesar de la similitud morfológica.

F. Mapas potenciales de distribución

Luego de confirmar la novedad de la salamandra negra de Tzunuj mediante datos genéticos y mediciones morfológicas y establecer la diferenciación con su clado, se procede a la generación de mapas de distribución potencial para el conocimiento de patrones históricos de distribución y colonización. En la Figura 17, se observa la distribución actual (2019) con patrones de variables climáticas, del clado del subgrupo *lincolni* según Wake y Lynch (1976). Esto indica que las cuatro especies de salamandra se encuentran distribuidas en ambientes con elevación mayor a 1800msnm, precipitación media o elevada (INSIVUMEH, 2019) y temperatura entre 15-25°C. Los patrones históricos del mioceno fueron propuestos por Wake (1982) pero establece que existe dificultad para conocer el estado sistemático de las poblaciones ya que, pudo haber existido una hibridación entre las poblaciones previamente aisladas (Wake *et al.*, 1981). Esto se puede respaldar por la alta similitud y el poco porcentaje de variación entre las especies de *B. franklini* y *B. lincolni* presentadas en el árbol filogenético de el gen citocromo B (Figura 16). Se infiere la probabilidad de la colonización del grupo *franklini* desde la vertiente Pacífica de Chiapas y los Cuchumatanes, que puede ser apoyado por las características climáticas y geológicas del Holoceno (Figura 18) que el área de los Cuchumatanes funcionaría como puente para la distribución actual.

G. Consideraciones finales

Es muy probable que desde la Hipótesis planteada por Wake *et al.* (1981), que la coloración negra sin rasgos distintivos de *B. meliana* fuera el primer brote para el stock ancestral que diera origen a el grupo *lincolni*, haya cambiado o se haya separado desde antes, dando origen a la salamandra negra de Tzunuj que genéticamente está relacionada de una manera más estrecha con el grupo *lincolni*, mientras que *B. meliana* ya se encuentra más diferenciada. Por lo tanto, se puede proponer una nueva Hipótesis donde las poblaciones ancestrales del grupo *lincolni* se hayan separado desde antes en dos poblaciones de salamandras negras aisladas o que haya ocurrido algún evento como la barrera biogeográfica del Valle de Salamá y Cobán. La barrera estaría dada entre la Sierra de las Minas y la montaña de Pamac y Tzunuj o que algún evento como la última glaciación separará a la población generando la alopatria del clado desde mucho antes, teniendo mayor tiempo para diferenciación genética para *Bolitoglossa meliana*. Esto indicaría que el patrón de color primitivo sea el negro y de este se derivaran los colores rojo y negro de las poblaciones de *B. lincolni* siendo este el ancestral a los patrones plateados y bronce de las salamandras de la vertiente Pacífica de montañas más jóvenes (*B. franklini*).

Para conocer a futuro como serán los patrones de migración o patrones de distribución, se proponen tres proyecciones climáticas, para el 2030 (Figura 19), el 2050 (Figura 20) y el 2070

(Figura 21). El 2030, indica que las variantes climáticas cambiarán aumentando temperatura y reduciendo precipitación, lo que limitaría la distribución de las salamandras evitando intercambio genético y generando islas o un aislamiento más marcado para las poblaciones, principalmente de la salamandra de Tzunuj y las poblaciones de *lincolni* en Quiché y Huehuetenango. Para el 2050 estas variables se ven aún más afectadas restringiendo más el área de distribución. Sin embargo, para el 2070, los patrones climáticos varían extremadamente, reduciendo la temperatura y aumentando la precipitación, lo que permite un aumento en el área de posible distribución de las salamandras del clado del subgrupo *lincolni*.

IX. CONCLUSIONES

Los patrones de aislamiento para las salamandras del clado del grupo *lincolni*, coinciden con las variaciones genéticas, indicando que la migración del clado viene de México y se adentra a las dos vertientes guatemaltecas antes del Pleistoceno, permitiendo que durante el Pleistoceno con el surgimiento de las barreras biogeográficas se aislaran las poblaciones.

El análisis genético de los fragmentos genéticos de ARN16s y CytB de la salamandra negra de Tzunuj, indican altos porcentajes de variación con respecto a las salamandras del clado del subgrupo *lincolni*, indicando que es una nueva especie.

La variación morfológica entre las tres salamandras del grupo *lincolni* (Wake y Lynch, 1976) y la salamandra negra de Tzunuj presentan variaciones significativas en cuanto a conteo de dientes, tamaño de cola, forma de dedos y cantidad de tejido de las patas, indicando una alta variación entre la salamandra negra de Tzunuj y el resto del clado.

La filogeografía de salamandras del clado del subgrupo *lincolni*, se infieren mediante variables climáticas y geológicas indicando que se necesita una temperatura entre 15-25°C una elevación mayor a 1800msnm y precipitación media para que las poblaciones del subgrupo *lincolni* estén presentes.

Los patrones históricos de distribución del subgrupo *lincolni*, se infieren mediante un análisis de las variables climáticas y geológicas del Holoceno, apoyado por los mapas de distribución del Mioceno generados por Wake (1982), que infieren que el patrón ancestral de coloración de el subgrupo *lincolni* sea el negro de las salamandras *B. meliana* y *Bolitoglossa* sp. Nov. y que las rutas de colonización vengan desde las montañas de Cuilco en la vertiente Pacífica de México.

X. RECOMENDACIONES

Primero que todo se sugiere el aumento de la muestra para tener análisis más robustos, principalmente en cuanto a secuencias del marcador ARN16s y si fuera posible aumentar el tipo de marcadores. Se sugiere el uso de otra estrategia genómica para la asignación taxonómica como lo es la caracterización de fragmentos de ADN y sus variaciones que se conocen como sitios de restricción, inserciones, supresiones y secuencias repetidas o microsatélites. Esto porque permite una detección de polimorfismos del tamaño de fragmentos amplificados (AFLP) y porque delinearía de una mejor manera la separación de las nuevas especies.

Se propone continuar con la investigación, analizando la pertenencia de *Bolitoglossa meliana* al clado, debido a todas las variaciones en cuando análisis genéticos que se tienen en la actualidad y así, poder continuar con la descripción del clado, reconociendo si cuenta con tres o cuatro especies.

Se recomienda también la generación de mapas con mayor antigüedad para conocer bien los patrones de aislamiento y las rutas que se utilizaron para la colonización de las montañas en Guatemala. Apoyado a esto es necesario el ampliar muestra de mediciones para poder diferenciar de una mejor manera las poblaciones y no estar sesgados a poblaciones con muchos individuos juveniles.

Para resaltar la importancia de esta investigación, se sugiere continuar con el estudio y como resultado, generar un plan de conservación para el clado, priorizando las áreas de desarrollo de estas y también sería ideal realizar un reconocimiento de las áreas de distribución de las especies del clado para identificar el estado en el que se encuentra cada uno y proponer un inventario de especies para conocer el estado de las poblaciones.

XI. LITERATURA CITADA

1. Acevedo, M., Wake, D. y Papenfuss, T. (2008) *Bolitoglossa meliana*. The IUCN Red List of Threatened Species e.T59179A11881715.
<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T59179A11881715.en>. Downloaded on 31 August 2019.
2. Acevedo, M., Wake, D., Papenfuss, T., Vásquez, C. y Rovito, S. (2008) *Bolitoglossa lincolni*. The IUCN Red List of Threatened Species: e.T59173A11893574.
<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T59173A11893574.en>. Descargado el 31 de agosto 2019.
3. AmphibiaWeb. 2019. <https://amphibiaweb.org> University of California, Berkeley, CA, USA. Accessed 11 Oct 2019.
4. Bertonatti, C. (1994) *Lista Propuesta de Anfibios y Reptiles Amenazados de Extinción*. Cuadernos de Herpetología, 8 (1): 164-171.
5. Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K, Ingram KK y Das I. (2006) *Cryptic species as a window on diversity and conservation*. Trends Ecol Evol, 22(3):148–155
6. Brcko, I. C., Hoogmoed, M. S., y Neckel-Oliveira, S. (2013) *Taxonomy and distribution of the salamander genus Bolitoglossa Duméril, Bibron y Duméril, 1854 (Amphibia, Caudata, Plethodontidae) in Brazilian Amazonia*. Zootaxa, 3686 (4), 401
<http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3686.4.1>
7. Brodie, E. D., Jr., M. Acevedo y J. A. Campbell. (2012) *New salamanders of the genus Oedipina (Caudata: Plethodontidae) from Guatemala*. Journal of Herpetology 46:233–240.
8. Campbell, J. A., E. N. Smith, J. Streicher, M. E. Acevedo y E. D. Brodie JR. (2010) *New salamanders (Caudata: Plethodontidae) from Guatemala with miscellaneous notes on known species*. Miscellaneous Publications of the Museum of Zoology, University of Michigan 200:1–60
9. Campbell, J. A., y Smith, E. N. (1998) *New Species of Nototriton (Caudata: Plethodontidae) from Eastern Guatemala*. Scientific Papers, Natural History Museum, University of Kansas 6:1–8.
10. Campbell, J.A. y J.P. Vannini. (1989) *Distribution of amphibians and reptiles in Guatemala and Belize*. Proceedings of the Western Foundation of Vertebrate Zoology, 4(1): 1-21
11. Castoe, T. A., E. N. Smith, J. Streicher, M. E. Acevedo y E. D. Brodie Jr. (2009) *Comparative phylogeography of pitvipers suggests a consensus of ancient Middle American highland biogeography*. Journal of Biogeography 36:88–103.
12. Chippindale, P. T., R. M. Bonett, A. S. Baldwin, and J. J. Wiens. (2004) *Phylogenetic evidence for a major reversal of life-history evolution in plethodontid salamanders*. Evolution 58:2809-2822.
13. Chun J, Rainey FA. (2014) *Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64: 316-324. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.054171-0>

14. Citation GBIF.org (02 Agosto 2019) GBIF Occurrence Descargado <https://doi.org/10.15468/dl.lodiao>
15. Daza, J. M., T. A. Castoe y C. L. Parkinson. (2010) *Using regional comparative phylogeographic data from snake lineages to infer historical processes in Middle America*. *Ecography* 33:343–354.
16. Dengo, G. (1968) *Estructura geológica, historia tectónica y morfología de América Central*. Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial, Guatemala City.
17. FAO. (2010) *Marcadores moleculares: una herramienta para explorar la diversidad genética sección C de, La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura*, editado por Barbara Rischkowsky y Dafydd Pilling. Sección C Roma (disponible en <http://www.fao.org/docrep/011/a1250s/a1250s00.htm>)
18. FAO. (2015) *Precipitación media anual en Centroamérica*
19. Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
20. Fick, S. Y R. Hijmans, (2017). *Worldclim 2: New 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas*. *International Journal of Climatology*
21. Fouquet A, Gilles A, Vences M, Marty C, Blanc M, Gemmell NJ. (2007) *Underestimation of species richness in neotropical frogs revealed by mtDNA analyses*. *PLoS One*, 2: e1109.
22. Gardner, T.W., Back, W., Bullard, T.F., Hare, P., Kesel, R.H., Lowe, D.R., Menges, C.M., Mora, S.C., Pazzaglia, F.J., Sasowsky, I.R., Troester, J.W. y Wells, S.G. (1987) *Central America & the Caribbean*. In: W.L. Graf (ed): *Geomorphic systems of North America: GSA Centennial Special Volume 2*. Geologic Society of America, Boulder, pp.343-402
23. Goraya. J., Wang. Y., Li. Z., O'Flaherty. F., O'Flaherty. M. y Floyd. C., (2000) *Peptides with antimicrobial activity from four different families isolated from the skins of the North American: frogs, Rana Luteiventris, Rana Barlandieri and Rana Pipiens*, *European Journal of Biochemistry* 247: 894-900.
24. Gouts N. y Salomone F., (2011) *Historia evolución y descripción de Anfibios*, <http://www.alihuen.org.ar/fauna-pampeana/historia-evolucion-y-descripcion-deanfibios.html>, 2 de marzo 2018.
25. Guo Y, Cai J.F., Xiong F., Wang H.J., Wen JF, Li J.B. y Chen H.Q. (2012) *The utility of mitochondrial DNA fragments for genetic identification of forensically important sarcophagid flies (Diptera: Sarcophagidae) in China*. *Tropical Biomedicine*; 29 (1): 51-60.
26. Hanken J. (1983) *Genetic variation in a dwarfed lineage, the Mexican salamander genus Thorius (Amphibia: Plethodontidae): taxonomic, ecological and evolutionary implications*. *Copeia*, 1983:1051–1073.
27. Hickman C., Roberts L., Larson A. (2001) *Integrated Principles of Zoology*, McGraw-Hill Publishing Co
28. Holdridge, L., Lamb, B. & Mason, B. (1950). *Los bosques de Guatemala*. Turrialba, Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura

29. Hubert N., Hanner R., Holm E., Mandrak NE, Taylor E. (2008) *Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes*. PLoS ONE 3(6): e2490 doi: 10.1371/journal.pone.0002490.
30. Islebe, G., M. Véliz. (2001) *Guatemala*. En: Kappelle, M., Brown, A. (Eds). *Bosques Nublados del Neotrópico*. Editorial INBio, Costa Rica. 231-241 pp.
31. Jain, S., M. Brahmhait, D. Rank, C. Joshi y J. Solank. (2007) *Use of cytochrome b gene variability in detecting meat species by multiplex PCR assay*. Indian Journal of Animal Sciences. 77 (9): 880-881.
32. Jones, W., 2010. Caudata families and distribution Descargado el 14 de septiembre 2019
33. Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, Park SC, Jeon YS, Lee JH, Yi H, Won S y Chun J. (2012) *Introducing EzTaxon-e: A prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62: 716-721. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.038075-0>
34. Köhler, G., (2001). *Amphibians of Central America*. Herpeton. 36:376
35. Koonin E. (2003) *Comparative genomics, minimal gene-sets and the last universal common ancestor*. Nature Rev. Microbiol. 1: 127-136. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro751>
36. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.
37. Landres, P.B., J. Verner, y J.W. Thomas. (1988) *Ecological uses of vertebrate indicator species: a critique*. Conserv. Biol. 2: 316-328.
38. Larson, A. (1984) *Neontological inferences of evolutionary pattern and process in the salamander family Plethodontidae*. *Evolutionary Biology* 17:119-217.
39. Lombard, R. E. y D. B. Wake. (1986) *Tongue evolution in the lungless salamanders, family Plethodontidae. IV. Phylogeny of plethodontid salamanders and the evolution of feeding dynamics*. *Systematic Zoology* 35:532-551.
40. Macey, J. R. (2005) *Plethodontid salamander mitochondrial genomics: A parsimony evaluation of character conflict and implications for historical biogeography*. *Cladistics* 21:194-202.
41. Marshall, J. S. (2007) *The geomorphological and physiographic provinces of Central America*. In J. Bundschuh and G. E. Alvarado (eds.), *Central America: Geology, Resources and Hazards*, pp. 75–122. Taylor & Francis, UK.
42. Mindell, D. P. y Honeycutt, R. L. (1990) *Ribosomal RNA in Vertebrates: Evolution and Phylogenetic Applications*. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 21(1), 541–566. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.21.110190.002545>
43. Moritz, C., C. J. Schneider, y D. B. Wake. (1992) *Evolutionary relationships within the *Ensatina eschscholtzii* complex confirm the ring species interpretation*. *Systematic Biology* 41:273–291.
44. Mueller, R. L., J. R. Macey, M. Jaekel, D. B. Wake, y J. L. Boore. (2004) *Morphological homoplasy, life history evolution, and historical biogeography of plethodontid salamanders inferred from complete mitochondrial genomes*. *PNAS* 101:13820-13825.

45. Nei M. and Kumar S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
46. Nijman, I.J., Otsen, M., Verkaar, E.L., de Ruijter, C. y Hanekamp, E. (2003) Hybridization of banteng (*Bos javanicus*) and zebu (*Bos indicus*) revealed by mitochondrial DNA, satellite DNA, AFLP and microsatellites. *Heredity*, 90: 10–16.
47. Palumbi, S. (1996) *Nucleic acids II: the polymerase chain reaction*. In D. M. Hillis, C. Moritz, and B. K. Mable (eds.), *Molecular Systematics*, pp. 204–247. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
48. Palumbi, S., A. Martin, S. Romano, W. O. McMillan, L. Stice y Grabowski, G. (2002). *The simple fool's guide to PCR*. Version 2.0 Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory. Pp. 10.
49. Parra-Olea, G., Wake, D., Acevedo, M., Muñoz-Alons, A., Vasquez, C. y Rovito, S. (2008) *Bolitoglossa franklini*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T59163A11880302. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T59163A11880302.en>. Downloaded on 31 August 2019.
50. Pineda-Schwarz, D., M. Alonso-Asencio, E. Arrivillaga-Cano, J. Cruz-Font, H. Dahinten-Bailey, I. Rosito-Prado y Ariano-Sánchez, D. (2018) *Geographic distribution, Caudata-Salamanders, Nyctanolis pernix*. *Herpetological Review* 49(3).
51. QIAGEN, 2006. DNeasy® Blood & Tissue Handbook. 28-30
52. Ramírez, A. (1998) *Inventario y plan de manejo de la finca Pamac II*. Finca Pamac II, Guatemala. 29 pp.
53. Ramírez-Bautista, A. y R. Cruz-Elizalde. (2013) *Reptile community structure in two fragments of cloud forest of the Sierra Madre Oriental, México*. *North-Western Journal of Zoology*. 9(2): 410-417.
54. Rovito, S. M., C. R. Vásquez-Almazán y T. J. Papenfuss. (2010) *A new species of Bolitoglossa (Caudata: Plethodontidae) from the Sierra de las Minas, Guatemala*. *Journal of Herpetology* 44:516–525.
55. Rovito, S., G. Parra-Olea, J. Hanken, R. Bonett, y D. Wake. (2013) *Adaptive radiation in miniature: the minute salamanders of the Mexican highlands (Amphibia: Plethodontidae: Thorius)*. *Biological Journal of the Linnean Society* 109:622–643.
56. Rovito, S., Vásquez-Almazán, C., Papenfuss, T. y Parra-Olea, G. (2015) *Biogeography and evolution of Central America cloud forest salamanders (Caudata: Plethodontidae: Cryptotriton), with the description of a new species*. *Zoological Journal of the Linnean Society* 175(1): 150-166.
57. Schuchert, C. (1935) *Historical Geology of the Antillean–Caribbean Region*. John Wiley and Sons, USA.
58. Sneath P.H.A. and Sokal R.R. (1973). *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco.
59. Solomon, E., L. Berg y D. Martin (2013) *Biología*. México: Cengage.
60. Stebbins R. y Cohen N., (1997) *A Natural History of Amphibians*, University Presses of California, Columbia and Princeton, USA

61. Steven J. Phillips, Miroslav Dudík, Robert E. Schapire. [Internet] Maxent software for modeling species niches and distributions (Version 3.4.1). Available from url: http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/maxent/. Accessed on 2019-9-19.
62. Stuart, L. C. (1943) Taxonomic and geographic comments on Guatemalan salamanders of the genus *Oedipus*. *Miscellaneous Publications of the Museum of Zoology, University of Michigan* 56:1–33.
63. Stuart, L. C. (1954) *A description of a subhumid corridor across northern Central America, with comments on its herpetofaunal indicators*. *Contributions from the Laboratory of Vertebrate Biology, University of Michigan* 65:1–20.
64. Tamura K. (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution* 9:678-687.
65. Vásquez-Almazán, C. R. y S. M. Rovito. (2014) *A new Species of Black Bolitoglossa (Caudata: Plethodontidae) from Guatemala*. The Society for the Study of Amphibians and Reptiles. *Journal of Herpetology*, 48(4): 518-524. DOI: <http://dx.doi.org/10.1670/13-170>
66. Vásquez-Almazán, C. R., S. M. Rovito, D. A. Good y D. B. Wake. (2009) *A new species of Cryptotriton (Caudata: Plethodontidae) from eastern Guatemala*. *Copeia* 2009:313–319.
67. Wake, D. B. (1966) *Comparative osteology and evolution of the lungless salamanders, family Plethodontidae*. *Memoirs of the Southern California Academy of Sciences* 4:1-111.
68. Wake, D. B. y J. F. Lynch. (1976) *The distribution, ecology and evolutionary history of plethodontid salamanders in tropical America*. *Natural History Museum of Los Angeles County Science Bulletin* 25:1–65.
69. Wake, D.B. y J.F. Lynch. (1982) *Evolutionary relationships among Central American salamanders of the Bolitoglossa franklini group, with a description of a new species from Guatemala*. *Herpetologica*, 38: 257- 272.
70. Wake, D.B., S.Y. Yang y T.J. Papenfuss. (1980) *Natural hybridization and its evolutionary implications in Guatemalan plethodontid salamanders of the genus Bolitoglossa*. *Herpetologica*, 36: 335-345.
71. Weyl, R. (1980) *Geology of Central America*. Gebrüder Borntraeger, Berlin.
72. Woose, C., y G. Fox. (1977) *Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(11), 5088-90.

Item	Cantidad	Monto unitario (Q)	Tiempo	Total (Q)	Fondo UVG	Fondo Universidad Manchester	Total, Estudiante(Q)
A. Viajes de campo							
Viáticos de viajes de campo	3	Q 1,000.00	3 semanas	Q 3,000.00	Q 500.00	Q -	Q 2,500.00
B. Transporte							
Gasolina	125gal	Q 25.92	NA	Q 3,630.00	Q -	Q -	Q 3,630.00
Mantenimiento del carro	1	Q 650.00	NA	Q 60.00	Q -	Q -	Q 60.00
C. Equipo de laboratorio							
		Costo de mantenimiento					
Incubadora (Boekel shake & bake)	1	Q 350.00	6 meses	Q 2,100.00	Q 2,100.00	Q -	-
Centrifuga (Eppendorf 5415D)	1	Q 325.00	6 meses	Q 1,950.00	Q 1,950.00	Q -	-
Balanza	1	Q 700.00	6 meses	Q 4,200.00	Q 4,200.00	Q -	-
Vortex	1	Q 150.00	6 meses	Q 900.00	Q 900.00	Q -	-
Nanodrop (nuevo)	1	Q 22,091.00	-	Q 22,031.00	-	Q 22,091.00	Q -
Espectrofotómetro UV/Vis (eppendorf Biophotometer plus)	1	Q 700.00	6 meses	Q 4,200.00	Q 4,200.00	-	Q -
Termociclador	1	Q 375.00	1 mes	Q 375.00	Q 375.00	Q 100.00	Q -
Fuente de poder electroforesis	1	Q 550.00	1 mes	Q 550.00	Q 550.00	-	Q -
Cámara de Electroforesis	1	Q 80.00	3 meses	Q 240.00	Q 240.00	-	Q -
Vernier	1	Q 70.00	1 mes	Q 70.00	Q 70.00	-	Q -
Estereoscopio	1	Q 325.00	1 mes	Q 325.00	Q 325.00	-	Q -
D. Material y reactivos							

MgCl2	250gr	Q	283.00	NA	Q	Q	Q	-	Q	-
					283.00	283.00				
Secuenciación	10	Q	38.41	NA	Q	Q	Q		Q	-
					384.10	384.10	384.00			
Cloroformo	1 litro	Q	336.00	NA	Q	Q	Q	-	Q	-
					336.00	336.00				
Total					Q	57,981.11	Q	28,125.83	Q	3,934.12
								23,965.16		

b. Cronograma

Actividad	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
Recolección, identificación y eutanasia de individuos	X						
Extracción de órganos	X						
Análisis taxonómico de individuos		X					
Extracción de ADN con kit (DNeasy)					X		
Cuantificación de ADN					X		
Secuenciación de muestras						X	
Obtención de secuencias							X

Actividad	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul
Protocolos Bioética		X					
Extracción de ADN (Jain <i>et al.</i> , 2007)			X	X	X		
Purificación de ADN				X	X		
Cuantificación de ADN				X			
Secuenciación de ADN				X			
Obtención de secuencias					X		
Alineación de secuencias					X		
Blast						X	
Consenso de secuencias con GenBank						X	

Actividad	Ago	Sept	Oct	Nov	Dic
Elaboración de marco teórico	X X X				
Entrega de protocolo		X			
Correcciones de protocolo		X			
Comparación de datos biogeográficos del clado	X X X X				
Medición de individuos del clado		X X			
Análisis de resultados		X			
Conclusiones		X			
Revisión			X		
Correcciones			X		
Entrega final			X		
Examen final					X

c. Script R

Análisis de PCA y NMDS

```
#Instalación de paquetes
```

```
library(stats)
```

```
library(FactoMineR)
```

```
library(vegan)
```

```
install.packages("FactoMineR")
```

```
install.packages("stats")
```

```
install.packages("factoextra")
```

```
install.packages("ISLR")
```

```
library(ISLR)
```

```
#Análisis de PCA
```

```
bolis <- read.csv("bolis_tesis.csv", header=T)
```

```
bolis$TL <- as.numeric(bolis$TL)
```

```
bolis$HLL <- as.numeric(bolis$HLL)
```

```
View(bolis)
```

```
names(bolis)datos.bolis <- bolis$i..Especie
```

```
dim(datos.bolis)
```

```
bolis2 <- na.omit(bolis[,-25])
```

```
pca <- prcomp(na.omit(bolis2[,6:ncol(bolis2)]))
```

```
summary(pca)
```

```
ordiplot(pca)
```

```
ordiellipse(pca,groups = bolis2$i..Especie, col = 1:3, label = T)
```

```
#Análisis de NMDS
```

```
nmads <- metaMDS(na.omit(bolis2[,6:ncol(bolis2)]), distance = "euclidian")
```

```
stressplot(nmads)
```

```
ordiplot(nmads)
```

```
ordiellipse(nmads,groups = bolis2$i..Especie, col = 1:3, label = T)
```

```
orditorp(nmads, display = "species", col = "red")
```

```
ordiplot(nmads)
```

```
ordiellipse(nmads,groups = bolis2$Sexo, col = 1:3, label = T)
```

```
###Dientes vomerianos vs Maxilares
```

```
nmds <- metaMDS(na.omit(bolis2[,27:28], distance = "euclidian"))
```

```
stressplot(nmds)
```

```
ordiplot(nmds)
```

```
ordiellipse(nmds, groups = bolis2$ï..Especie, col = 1:3, label = T)
```

```
orditorp(nmds, display = "species", col = "red")
```

```
library(ggplot2)
```

```
ggplot(data = bolis2, aes(x = MT, y = VT, color = ï..Especie)) + geom_point() + stat_smooth(method = "lm")
```

```
ggplot(data = bolis2, aes(y = MT, color = ï..Especie)) + geom_boxplot()ggplot(data = bolis2, aes(y = VT, color = ï..Especie)) + geom_boxplot()
```

d. BLAST

Job title: SAL1_16S

RID [GFNYCV9G014](#) (Expires on 06-19 02:11 am)

Query ID [Id|Query_11403](#)
Description [Contig\[0001\]](#)
Molecule type dna
Query Length 532

Database Name nr
Description Nucleotide collection (nt)
Program BLASTN 2.9.0+

Graphic Summary



Figura 1.1. Blast de marcador ARN 16s para salamandra *Bolitoglossa* sp. Nov 1.

Job title: SAL2_16S

RID [GFP1G0CA014](#) (Expires on 06-19 02:13 am)

Query ID lc|Query_57321
Description Contig[0002]
Molecule type dna
Query Length 466

Database Name nr
Description Nucleotide collection (nt)
Program BLASTN 2.9.0+

Graphic Summary

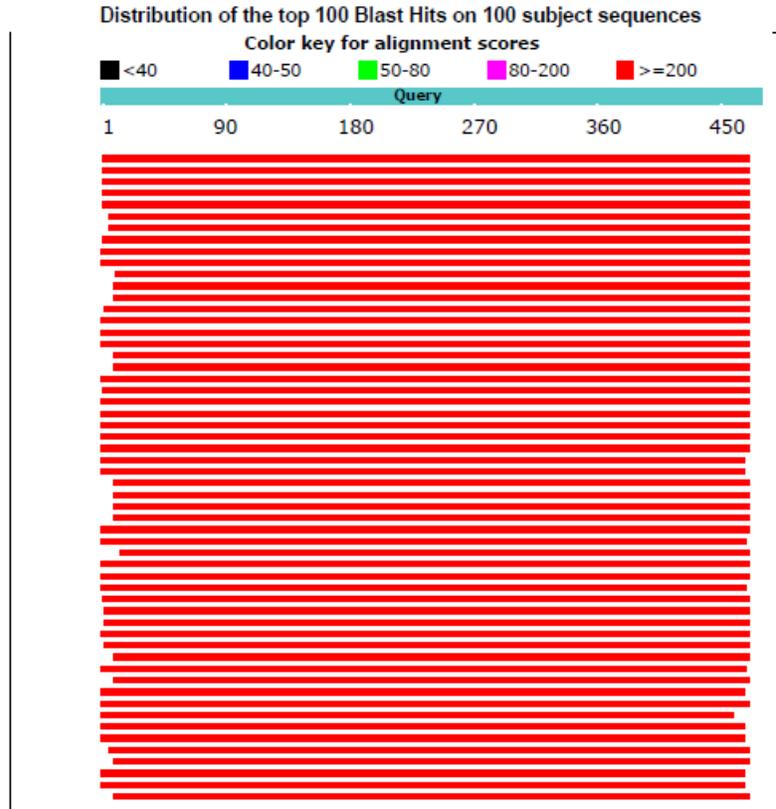


Figura 1.2. Blast de marcador ARN 16s para salamandra *Bolitoglossa* sp. Nov 2.

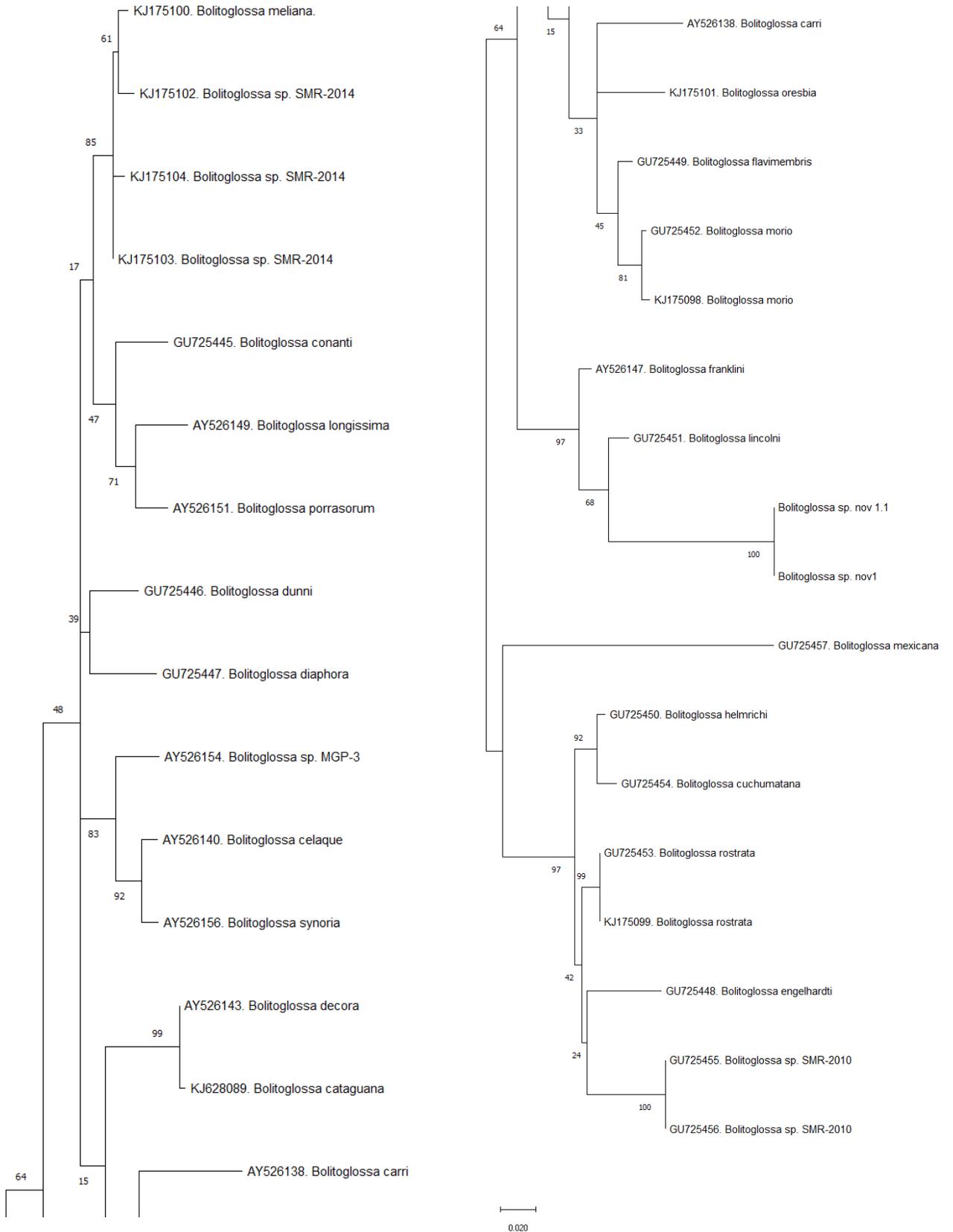
Cuadro 1.1. Datos de medidas morfológicas de las salamandras pertenecientes al clado *lincolni*

Especie	Departamento	Código	Altitud	Sexo	SVL	SL	TL	SA	AG	FL	HLL	SGF	Cg	Lim	PECW	HW	F	LiiiF	LiiiT	LvT	E	H	DBE	LMG	E	D	V	M	P
<i>Bolitoglossa meliana</i>	Alta Verapaz	48587	2160	M	48	53	56	16	27	10	12	13	11	3	7.19	6.59	5	4.7	5.8	4.2	3.8	8.6	4.5	2.71	2	3	2	48	3
<i>Bolitoglossa meliana</i>	El Progreso	32877	2760	H	57	62	59	21	30	15	16	17	11	3	6.97	6.96	6	5.6	7.3	6.1	4	10	5.2		3	4	2	60	3
<i>Bolitoglossa meliana</i>	Baja Verapaz	58565		H	47	51	47	16	26	12	12	13	11	3	5.59	4.56	6	4.9	5	4	3.8	8.1	4		2	3	2	59	3
<i>Bolitoglossa meliana</i>	Quiché	38591	2430	H	28	32	19	10	15	7	6.7	7.7	11	3	4.18	2.35	3	2.1	2.8	2.1	2.1	5.8	2.9		2	2	1	13	3
<i>Bolitoglossa meliana</i>	Quiché	38592	2430	H	16	17	10	6	7	4	4.6	5.2	11	3	2.49	1.25	2	1.3	1.5	0.9	1.3	3.4	1.5		1	1	4	2	2
<i>Bolitoglossa meliana</i>	Quiché	38593	2430	H	39	42	34	13	20	10	9.9	10	11	3	5.17	4	5	3.3	4.4	1.9	2.8	6.5	3.5		2	2	1	25	3
<i>Bolitoglossa meliana</i>	Quiché	38594	2430	H	38	41	25	13	20	9	10	10	11	3	5.28	3.71	4	3.4	3.9	2.8	2.8	7.1	3.7		2	3	1	17	3
<i>Bolitoglossa meliana</i>	Quiché	38595	2430	M	56	61	49	18	32	15	16	14	11	2	7.92	6.15	8	5.9	6.9	5	4.6	10	5.7	3.82	3	5	1	63	4
<i>Bolitoglossa meliana</i>	Quiché	38596	2430	H	74	80	72	17	45	16	18	17	11	4	10.54	6.34	8	6	7.4	5.4	4.5	11	5.9		3	5	3	61	6
<i>Bolitoglossa meliana</i>	Quiché	38597	2430	H	44	49	40	14	25	11	13	12	11	3	5.85	4.37	5	4.3	5	3.3	2.8	7.4	4.2		2	3	2	41	4
<i>Bolitoglossa meliana</i>	Quiché	38598	2430	H	48	54	43	16	28	11	13	12	11	3	7.85	5.1	6	4.2	5.2	2.9	3.4	8.7	4.8		2	3	2	47	4
<i>Bolitoglossa meliana</i>	Quiché	38599		H	72	78	70	21	44	15	19	16	11	4	9.14	6.29	9	5.9	6.7	4.5	3.8	11	5.6		3	5	3	65	6
<i>Bolitoglossa meliana</i>	Quiché	38600	2430	H	68	73	60	20	39	16	18	16	11	4	8.86	6.39	8	6	6.7	5.1	4.6	11	5.2		3	4	2	58	7
<i>Bolitoglossa meliana</i>	Quiché	38601	2430	H	72	77	46	22	44	17	19	17	11	4	9.49	6.54	8	5.9	7.5	5.5	4.3	11	6		3	4	2	64	6
<i>Bolitoglossa meliana</i>	Quiché	38602	2430	H	59	63	54	19	34	14	17	15	11	4	8.31	6.03	7	5.2	5.9	4.5	4.2	9.6	5.4		2	4	3	56	7
<i>Bolitoglossa meliana</i>	Quiché	38603	2430	H	53	57	50	16	30	13	14	13	11	3	7.15	5.2	6	4.9	5.7	4.1	3.3	9.3	4.9		3	3	2	46	5
<i>Bolitoglossa meliana</i>	Quiché	38604	2430	M	59	65	64	19	34	16	17	16	11	2	8.37	6.18	8	5.5	6.2	3.9	3.9	9.9	5.1	4.47	3	4	3	64	5
<i>Bolitoglossa meliana</i>	Quiché	38605	2430	H	44	48	40	14	25	11	13	11	11	3	5.85	4.59	6	3.3	3.7	3.1	4	8.1	4.3		2	3	1	45	3
<i>Bolitoglossa meliana</i>	Quiché	38606	2430	M	54	59	53	17	32	14	15	14	11	3	7.23	5.04	8	5.3	7.2	4.6	3.9	9.1	5	3.28	3	4	2	66	2
<i>Bolitoglossa meliana</i>	Quiché	38607	2430	M	49	53	49	15	27	13	14	13	11	3	7.09	5.31	6	4.6	5.3	3.3	4.4	8.7	4.6	2.21	3	2	2	46	3
<i>Bolitoglossa meliana</i>	Quiché	38608	2430	H	26	28	17	9	13	7	7.4	7.3	11	2	4	2.22	3	2	2.4	1.2	2.4	5	1.9		1	1	1	15	3
<i>Bolitoglossa meliana</i>	Quiché	38609	2430	M	53	56	51	16	29	14	14	13	11	3	7.23	5.11	6	4.5	5.5	3.8	3.9	8.6	4.8	2.72	3	4	2	56	3
<i>Bolitoglossa meliana</i>	Quiché	38610	2430	M	58	63	63	18	33	17	15	15	11	2	7.55	6.38	7	5.6	6.7	3.4	3.8	9	4.1	4.22	3	4	2	59	3
<i>Bolitoglossa meliana</i>	Quiché	38611	2430	H	71	79	71	22	43	17	19	18	11	3	10.21	6.92	8	6	7.3	4.2	4.6	12	5.9		3	5	2	55	7
<i>Bolitoglossa meliana</i>	Quiché	38612	2430	H	70	77	72	21	42	17	19	18	11	3	9.09	6.77	9	6.2	8	5.3	4.3	10	5.5		3	4	3	64	8
<i>Bolitoglossa meliana</i>	Quiché	38613	2430	H	55	59	52	18	29	15	15	13	11	3	7.91	4.33	6	4.7	5.3	3.8	3.3	9.4	5.4		3	3	2	52	7
<i>Bolitoglossa lincolni</i>	Huehuetenango	51484	2731	M	55	60	51	18	30	14	15	15	11	4	10.34	5.25	7	5.4	6.3	4.8	3.5	9.5	5.2	3.77	3	4	2	50	3
<i>Bolitoglossa lincolni</i>	Huehuetenango	51485	2040	H	63	69	60	19	36	15	15	15	11	4	9.02	6.88	8	5.8	6.9	4.8	3.6	10	5.1		3	3	3	71	4

Especie	Departamento	Código	Altitud	Sexo	SVL	SL	TL	S	A	FL	HLL	SG	C	Li	PEC	HW	F	Liii	Liii	Lv	E	H	DB	LM	E	D	V	M	P
					L			A	G			F	g	m	W	D	W	F	T	T	W	W	E	G	N	N	T	T	T
<i>Bolitoglossa lincolni</i>	Huehuetenango	51486	2040	H	76	83	69	23	45	19	20	19	11	4	10.62	7.08	9	6.3	8.1	5.3	4.7	13	5.8		2	4	3	66	4
<i>Bolitoglossa lincolni</i>	Huehuetenango	51499	2260	H	73	79	59	21	43	17	17	17	11	4	11.64	8	9	7.4	7.8	5.8	3.7	13	5.8		3	4	2	68	5
<i>Bolitoglossa lincolni</i>	Huehuetenango	58148	1900	H	66	73	64	21	38	15	19	16	11	4	10.28	6.64	9	7.1	7.7	5.5	4.1	12	5.9		3	4	3	60	4
<i>Bolitoglossa lincolni</i>	Quiché	51447	2140	H	69	75	60	20	42	16	17	17	11	4	10.25	6	8	5.9	7.2	4.3	3.8	12	5.2		3	4	3	58	5
<i>Bolitoglossa lincolni</i>	Quiché	51448	2140	H	42	46	35	14	23	11	11	11	11	4	6.58	4.01	6	3.5	4.1	2.7	3.2	8	3.9		2	3	2	46	4
<i>Bolitoglossa lincolni</i>	Quiché	51449	2141	H	42	46	33	12	24	11	11	10	11	4	5.34	3.77	4	4.1	4.3	3	2.5	7.4	3.5	2.11	2	2	2	34	4
<i>Bolitoglossa lincolni</i>	Quiché	51450	2140	M	62	67	53	20	35	15	16	16	11	4	8.13	6.47	7	5.5	6.2	4.6	3.7	10	5.6	4.5	3	4	2	41	3
<i>Bolitoglossa lincolni</i>	Quiché	51469	2140	H	50	53	42	16	27	11	13	13	11	4	6.75	5.14	6	4.5	5.1	2.5	3.1	8.8	4.3		2	3	3	41	3
<i>Bolitoglossa lincolni</i>	Quiché	51470	2225	M	43	46	36	14	24	11	12	12	11	3	4.93	4.1	4	3.1	3.9	2	2.9	7.5	3.8	3.27	2	3	1	39	4
<i>Bolitoglossa lincolni</i>	Quiché	51471	2235	M	43	47	37	14	23	10	12	11	11	3	6.4	4.11	5	3.7	4.8	3	2.9	8.5	4	2.45	2	3	2	38	4
<i>Bolitoglossa lincolni</i>	Quiché	51472	2390	H	35	39	26	12	20	9	9	10	11	3	5.24	2.99	4	3	3.9	2.4	2.4	6.8	3.1		2	2	2	24	4
<i>Bolitoglossa lincolni</i>	Quiché	51473	2430	M	47	50	40	15	25	11	13	12	11	3	6.52	4.54	6	4.2	4.9	3.3	2.5	8.2	4	2.37	2	3	3	45	4
<i>Bolitoglossa lincolni</i>	Quiché	51474	1935	H	67	73	50	21	37	15	16	16	11	4	9.36	6.81	9	6.6	7.6	5.8	4.3	12	5		3	4	2	58	4
<i>Bolitoglossa lincolni</i>	Quiché	51475	1935	H	51	55	51	16	29	11	13	13	11	3	7.81	4.8	7	5	5.8	4.5	3	9.7	4.4		2	3	3	43	3
<i>Bolitoglossa lincolni</i>	Quiché	51476	1935	H	36	38	24	11	20	8	10	9.2	11	3	4.81	3.26	4	2.8	3.2	2.1	2.5	6.2	2.9		2	2	1	21	4
<i>Bolitoglossa lincolni</i>	Quiché	51477	1935	H	55	61	2.09*	18	32	14	17	14	11	3	8.14	5.57	7	5.1	6.5	4.2	3.5	10	4.8		2	3	3	60	4
<i>Bolitoglossa lincolni</i>	Quiché	51478	1935	M	34	37	25	12	19	9	9.9	9.8	11	3	5.41	2.98	4	3.1	3.6	2.6	3	7	3.5		2	2	1	23	4
<i>Bolitoglossa lincolni</i>	Quiché	51479	1935	H	40	43	9.97*	13	22	10	12	10	11	3	5.55	3.65	5	3.4	4.4	3.4	2.8	7.3	3.1		2	2	2	36	4
<i>Bolitoglossa lincolni</i>	Quiché	51480	2040	H	34	37	26	12	18	9	9.6	9.1	11	3	4.99	3.03	4	2.9	3.5	2.4	2.7	6.7	3.3		2	3	2	23	4
<i>Bolitoglossa lincolni</i>	Quiché	51481	2040	M	36	40	27	12	20	8	10	9.7	11	3	5.37	3.91	5	3.5	4.2	2.9	2.6	6.8	3.3		2	2	2	32	4
<i>Bolitoglossa lincolni</i>	Quiché	51482	2190	H	49	54	44	17	27	13	13	13	11	4	7.91	5.05	7	4.9	5.7	4	3.5	9.3	4.7		3	3	2	47	4
<i>Bolitoglossa lincolni</i>	Quiché	51483	2190	M	60	62	8.95*	18	32	16	15	15	11	3	7.31	6.22	7	5.9	6.6	4.2	3.6	10	5.4	5.75	3	4	2	33	4
<i>Bolitoglossa lincolni rev. resplendens</i>	San Marcos	18237		M	46	50	46	15	26	14	14	12	11	3	6.31	5.55	3	4.7	5	2.7	3.6	8.3	4.8	3.58	2	3	2	41	2
<i>Bolitoglossa lincolni rev. resplendens</i>	San Marcos	18238		H	76	80	69	23	46	17	18	18	11	3	12.89	7.39	9	6.9	7.7	4.7	4.2	13	6		3	4	2	69	10
<i>Bolitoglossa lincolni rev. resplendens</i>	San Marcos	18239		H	31	34	2.37*	11	17	8	N/A	9.1	11		4.6	2.71		2.3			3	6.3	3.5		2	2	1	16	3

Especie	Departamento	Código	Altitud	Sexo	SVL	SL	TL	S	A	FL	HLL	SG	C	Li	PEC	HW	F	Liii	Liii	Lv	E	H	DB	LM	E	D	V	M	P
					L			A	G			F	g	m	W	D	W	F	T	T	W	W	E	G	N	N	T	T	T
<i>Bolitoglossa lincolni rev. Meliana</i>	San Marcos	51388	2215	H	23	24	3.26*	8	11	6	N/A	6.7	11		3.65	2.08		1.4			2.1	4.8	2.2		1	1	1	8	0
<i>Bolitoglossa franklini</i>	San Marcos	18233		H	59	63	56	17	35	15	16	14	11	2	7.21	4.39	7	4.2	6	4.1	3.5	9.9	4.4		2	3	2	66	0
<i>Bolitoglossa franklini</i>	San Marcos	18234		M	51	57	58.24*	16	29	15	16	13	11	1.5	6.92	4.17	7	4.5	6	3.9	3.6	8.6	4.5	3.3	2	4	2	59	0
<i>Bolitoglossa franklini</i>	San Marcos	18235		H	56	61	65	18	32	15	16	14	11	3	7.78	5.76	7	4.3	5	3.2	4	9.9	5		2	4	3	47	0
<i>Bolitoglossa franklini</i>	San Marcos	42569	1800	H	29	31	26	12	16	8	8.3	8.3	11	2	4.84	2.93	4	2.1	2.5	1.5	2.7	6.2	3		2	3	2	35	0
<i>Bolitoglossa franklini</i>	San Marcos	42570	1800	H	46	49	43	14	26	12	12	11	11	2	5.8	3.22	5	3.5	4.5	2.9	3	8.2	3.8		2	3	2	52	0
<i>Bolitoglossa franklini</i>	San Marcos	42571	1800	H	33	36	27	11	19	9	9	9	11	1.5	4.57	2.4	4	2.1	2.9	1.6	2.7	6.5	3.1		1	3	2	40	0
<i>Bolitoglossa franklini</i>	San Marcos	48365	1880	J	28	31	24	11	15	7	7.9	7.9	11	2	3.59	2.22	3	1.7	2.7	1.8	2.4	5.6	3.3		2	2	2	29	0
<i>Bolitoglossa franklini</i>	San Marcos	48669	1880	J	27	29	22	9	16	6	6	7.6	11	2	3.96	2.2	3	1.8	2.2	1.7	1.8	4.8	2.7		1	2	1	23	0
<i>Bolitoglossa franklini</i>	San Marcos	48520	1825	M	48	52	55	16	24	14	15	12	11	2	7.19	5.42	7	5.1	4.6	3.4	3.7	8.3	4.7	4.2	3	4	2	60	0
<i>Bolitoglossa franklini</i>	San Marcos	48521	1825	H	57	61	56	13	31	16	16	16	11	2	8.41	4.9	7	4.6	5.7	4.2	3.7	10	5.2		3	4	3	65	0

e. Árbol filogenético ARN16s



f. Árbol filogenético CytB

