



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Ciencias Biológicas

Taxonomía integrativa de la rana endémica mexicana de orejas chicas (*Rheohyla
miotympanum*)

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencias
Biológicas

Presenta
Oscar Antonio Rayas Estrada

Dirigido por:
Dr. Oscar Ricardo García Rubio

Dr. Oscar Ricardo García Rubio
Presidente

Dr. Fidel Landeros Jaime
Secretario

Dr. Víctor Hugo Cambrón Sandoval
Vocal

Dra. Tamara Guadalupe Osorno Sánchez
Suplente

Dr. Abel Antonio Batista Rodríguez
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Fecha de aprobación por el Consejo Universitario junio 2019
México

Dedicatorias

A mis padres, Oscar y Lorena, por su apoyo incondicional durante todo el proceso de la maestría, por sus consejos y ánimos en todo momento. Por siempre estar presente en cada momento durante estos dos años y por siempre aguantar a mis perros en todas las salidas a campo. A mi abuelita por ser una de las personas más importante en mi vida y por siempre estar al pendiente de mis trabajos. A toda mi familia, hermano y hermana, tíos y tías, por estar presentes y siempre al pendiente del trabajo y resultados que estábamos obteniendo en su momento. A mis suegros, que desde lejos me mandaban sus ánimos y me hacían sentir mejor en aquellos momentos de estrés. Finalmente, al amor de mi vida, mi esposa Karla Zaldaña, que sin duda fue mi brazo derecho durante todo mi posgrado, por estar presente en las buenas y en las malas, en los momentos felices y en mis frustraciones, por siempre alegrarme , aconsejarme y aguantarme, que sin ella, no hubiera podido llevar a cabo mi trabajo.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Querétaro por el apoyo durante mi posgrado. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo de mi beca durante los dos años de duración del posgrado. A la secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales por otorgarme los permisos correspondientes para llevar a cabo el trabajo. Al comité de Bioética de la Universidad Autónoma de Querétaro por su visto bueno y autorización para continuar con nuestro trabajo. A mi director, Dr. Oscar García por su apoyo en todas las facetas del posgrado, sus consejos, apoyo, ánimos y sobre todo por compartir su conocimiento para llevar a cabo el trabajo lo mejor posible. A mis asesores sin importar el orden, Dr. Abel Batista, Dr. Fidel Landeros, Dr. Víctor Hugo Cambrón y a la Dra. Tamara Osorno por su apoyo en los diferentes ámbitos del trabajo, acústicos, moleculares, diseño experimental y generación de mapas. A los Biól. Belinda de la Cruz, Kevin Herroz y Mario Lugo por su apoyo durante la fase de campo del trabajo, que sin duda, fueron parte importante del equipo de trabajo. Finalmente, a mi esposa, Karla Zaldaña, por su apoyo incondicional en todo momento, por la toma de datos morfométricos en campo, por la generación de los mapas para este trabajo, sus consejos y ánimos en todo momento. A todos aquellos que de alguna forma estuvieron en contacto con este trabajo. A mi familia por su apoyo en este proceso. A todas las personas de las comunidades en donde estuvimos muestreando, a Olivia y Jacinto por permitirnos quedarnos en su casa, a Emanuel y su familia por el apoyo, a Don Lole por su apoyo durante el muestreo en la cascada de Chuveje y finalmente, a la Finca Santa Mónica que nos permitió realizar nuestras colectas de datos.

Contenido

1. Resumen.....	6
2. Abstract	7
3. Introducción	8
4. Capítulo 1	12
5. Capítulo 2	26
6. Discusión	45
7. Conclusión	47
8. Referencias.....	47

Índice de Tablas

Capítulo 1.

Tabla 1.....	18
--------------	----

Índice de Figuras

Capítulo 1.

Figura 1.....	15
---------------	----

Figura 2.....	19
---------------	----

Figura 3.....	20
---------------	----

Capítulo 2.

Figura 1.....	29
---------------	----

Figura 2.....	33
---------------	----

Figura 3.....	35
---------------	----

Figura 4.....	39
---------------	----

Figura 5.....	40
---------------	----

1. Resumen

La vocalización de anuros es uno de los parámetros más importantes en la comunicación social y tiene un papel muy importante en atraer hembras o competencias agresivas de individuos o conspecíficos. Los llamados de advertencia de anuros son específicos de especie y son una herramienta útil para identificar y reconocer especies crípticas, que son morfológicamente indistinguibles. *Rheohyla miotympanum* es una rana endémica a México que se distribuye en la Sierra Madre Oriental y forma parte del género monotípico *Rheohyla*. El principal objetivo de este estudio fue caracterizar la vocalización de este anuro en cuatro poblaciones de la Sierra Madre Oriental, para evidenciar si existen diferencias entre ellas. Al encontrar diferencias en la vocalización, se llevaron a cabo análisis morfológicos y moleculares para confirmar la existencia de una nueva especie. Los machos fueron grabados usando una grabadora digital Tascam DR-40 y un micrófono direccional Marantz a menos de 1 m de distancia. Se midió la temperatura, humedad relativa, distancia de la percha, presencia de otros individuos y longitud de hocico-cloaca. La estructura temporal y espectral del canto fue analizada usando Raven Pro 1.5. Se analizaron 870 llamados de advertencia de 44 machos vocalizando en cuatro sitios de México. Se analizaron ambas estructuras espectrales y temporales del canto usando nueve parámetros. Se secuenciaron tres genes mitocondriales 16S, Citocromo b y Citocromo oxidasa I para determinar la variación genética. Los llamados de advertencia están formados por una a ocho notas de tipo A o B. *R. miotympanum* tiene una tasa de llamado de 0.32-0.48, una frecuencia dominante de 2872.68 Hz y una duración del llamado de 0.21seg. Así mismo, comentamos algunos puntos del llamado de liberación de un macho en amplexo. Por su parte, los especímenes de Querétaro y San Luis Potosí difieren en sus secuencias 16S, Cytb y COI en 4.7%, 9% y 12% respectivamente, en comparación a los especímenes de Veracruz, así como la presencia de caracteres morfológicos diferentes. En base a las diferencias genéticas, morfológicas y de comportamiento (canto), se describen a los especímenes de San Luis Potosí y Querétaro como una nueva especie de la Sierra Madre Oriental, llamada *Rheohyla orientalis*.

Palabras clave: Bioacústica, Molecular, Morfología, Taxonomía integrativa, Vocalización.

2. Abstract

Vocalization of anuran amphibians is one of the most important parameters in communication in social interaction and plays an important role in attracting females or aggressive competition of individuals or conspecific males. Advertisement calls of anurans are specie-specific and are a useful tool to identify and recognize cryptic species, which are morphologically undistinguished. *Rheohyla miotympanum* is an endemic Mexican hylid frog occurring in Sierra Madre Oriental in Mexico and is part of a monotypic genus, *Rheohyla*. The main goal for this work was characterize the anuran vocalization in four populations from Sierra Madre Oriental, to show any differences between them. Due to the finding of vocalization differences, we carried out morphological and molecular analysis to confirm the existence of new specie. Males were recorded using a Tascam DR-40 digital recorder and a Marantz shotgun microphone less of 1 m of distance from the target. Temperature, relative humidity, perch distance, presence of other individuals and snout-vent length were measured. Temporal and spectral call structure were analyzed using Raven Pro 1.5 software. We analyzed 870 advertisement calls from 44 vocalizing males in four sites in Mexico. Also, we analyzed both temporal and spectral structure of the calls, using nine parameters. Three mitochondrial genes 16S, Cytochrome b and Cytochrome Oxidase I were sequenced to determine genetic variation. The advertisement call is formed by one to eight notes type A or B. *R. miotympanum* has a call rate of 0.32-0.48, dominant frequency of 2872.68 Hz and call duration of 0.21 sec. Likewise, we commented some points of the release call from a male in amplex. Individuals from Queretaro and San Luis Potosi differed in their sequences in 16S, Cytb and COI in 4.7%, 9% 12% respectively, respect to the individuals from Veracruz, as well as differences in morphological characters. We described *Rheohyla orientalis* as new specie from the Sierra Madre Oriental, according to molecular, morphological and behavior (calls) differences.

Key words: Bioacoustics, Integrative Taxonomy, Molecular, Morphology, Vocalization.

3. Introducción

En México, los anfibios son un grupo de vertebrados poco estudiados, a pesar de su alto nivel de endemismo en el país y su importancia ecológica. Los estudios de anfibios se generalizan dentro de los temas de alimentación, defensa, biología poblacional e interacciones con el ambiente (Duellman y Trueb, 1994) o formando parte de los inventarios faunísticos.

Estos son depredadores de invertebrados y algunos vertebrados pequeños, y son presa de muchos otros organismos. Estas interacciones, los hacen parte vital de la red trófica en los ecosistemas. Sin embargo, desde hace más de dos décadas, se ha documentado la disminución en sus poblaciones (Alford y Richards, 1999) debido a la susceptibilidad a diferentes contaminantes o cambios ambientales, por lo cual son considerados indicadores importantes de la salud de un ecosistema (Welsh y Ollivier, 1998). Por ello, los anfibios pueden ser excelentes indicadores en la restauración de un ecosistema, pero se requiere una clara comprensión de cómo los anfibios responderán a los cambios del ambiente (Rice *et al.*, 2006).

Dentro de esta clase, los hylidos conforman una de las familias más diversas a nivel mundial. Duellman y colaboradores (2016) mencionan que el número de especies reconocidas se ha incrementado sustancialmente, de las 27 especies agrupadas en un único género, descritas por Daudin en 1802, a las 951 especies y 57 géneros actualmente reconocidas, y que representan alrededor del 14.5% de las 6,629 especies de anfibios (Wiens *et al.*, 2010; Duellman *et al.*, 2016). La mayoría de las especies pertenecientes a esta familia son arbóreas y son conocidos como ranas de árbol (Wiens *et al.*, 2010). Wiens y colaboradores (2005) reconocen tres subfamilias de hylidos- Hylinae, Pelodyadinae y Phyllomedusinae.

Se han descrito aproximadamente 376 especies de anfibios para el país, de los cuales 237 especies son del orden Anura, 137 especies al orden Caudata y dos especies corresponden al orden Gymnophiona, considerándose México el quinto país con mayor diversidad de anfibios (Parra-Olea *et al.* 2014). Según Parra-Olea y colaboradores (2014), de las 237

especies para México, 97 especies pertenecen a la familia Hylidae, siendo esta la familia más diversa y representativa de este orden.

Por otra parte, la identificación de taxones cambia de forma continua. Las especies no están inequívocamente definidas y sus designaciones basadas en una categoría sencilla de caracteres taxonómicos (morfología) puede ser cuestionable, incluso en mamíferos (Mazzamuto *et al.*, 2016). Las técnicas moleculares y más recientemente, el uso del código de barras del DNA para el proceso de identificación de entidades biológicas han abierto la puerta a una integración real del conocimiento para incrementar métodos teóricos y prácticos (Mazzamuto *et al.*, 2016).

La integración de nuevos conocimientos y métodos de biología poblacional, filogenética, y otras disciplinas evolutivas dentro de la taxonomía ha ido creciendo, de acuerdo al consenso emergente por las delimitaciones de las especies incluyendo linajes de poblaciones o metapoblaciones (Padial *et al.*, 2010). Los taxónomos mencionan la importancia de conocer las causas de origen y determinar las trayectorias evolutivas para estudiar procesos de especiación y la propia taxonomía (Padial *et al.*, 2010). La descripción de una especie basándose no solo en su morfología, sino combinando diferentes métodos, como análisis filogenéticos, de barreras reproductivas y bioacústicos, dará evidencia más sólida del linaje de las especies (Padial *et al.*, 2009).

Los métodos tradicionales en combinación con caracteres moleculares y fenotípicos (bioacústica y morfometría) ha incrementado el conocimiento en los límites entre especies, principalmente en grupos que muestran alta diversidad críptica, como los anfibios, que son por lo menos superficialmente indistinguibles morfológicamente (Vacher *et al.*, 2017). La taxonomía integrativa, la cual fue introducida formalmente en el año 2005 (Pante *et al.*, 2015), es un enfoque multidisciplinario donde los caracteres morfológicos en la taxonomía tradicional se combinan con otros enfoques y datos adicionales (molecular, conductual, desarrollo y ecológico) (Mazzamuto *et al.*, 2016).

Dadas las limitantes, el uso de nuevas herramientas es importante, particularmente para desarrollar métodos complementarios basándose en la integración de diferentes tipos de

data para mejorar los procedimientos existentes en la delimitación e identificación de especies crípticas y relacionadas (Wang *et al.*, 2016).

Como en muchos otros organismos, en las últimas tres décadas se ha incrementado el descubrimiento y descripción de nuevas especies de anfibios, la mayor parte en regiones tropicales, por la aplicación de herramientas integrativas usando caracteres moleculares, morfológicos y bioacústicos (Rakotoarison *et al.*, 2017). Rakotoarison y colaboradores (2017) identificaron y describieron 26 especies nuevas del género *Stumpffia* (Anura: Microhylidae) para Madagascar, África, usando taxonomía integrativa. Por su parte, Glaw y colaboradores (2010) describieron 10 nuevas especies asignadas al género *Boophis* (Anura: Mantellidae) y resucitaron dos especies de su sinonimia combinando caracteres morfológicos, bioacústicos y moleculares.

Por su parte, Tubaro (1999) menciona la existencia de grandes esfuerzos por conocer la biodiversidad mundial y con ello identificar y definir zonas para la conservación. Sin embargo, para ello, es necesario diagnosticar a las especies y establecer sus relaciones de parentesco (Tubaro, 1999). Por ello el estudio de las vocalizaciones puede ser una herramienta adecuada para describir y confirmar las diferencias entre especies (Tubaro, 1999).

Los llamados de advertencia en los anuros son considerados como uno de los caracteres más importantes para la identificación de especies, incluso más que los caracteres morfológicos (Roy y Elepfandt, 1993). La vocalización en anuros es una herramienta invaluable para el estudio de la ecología y distribución de estos anfibios, toda vez que los llamados de las especies consideradas hayan sido descritos (Roy y Elepfandt, 1993). Kaya y Simmons (1999), compararon dos especies del género *Hyla* usando los llamados de advertencia para determinar variaciones acústicas en parámetros que pudieran estar relacionados en su estado taxonómico, encontrando diferencia en los parámetros temporales del canto. Ello evidencia la utilidad de la bioacústica como una herramienta en la sistemática moderna.

Finalmente, la especie *Rheohyla miotympanum* (Anura: Hylidae) es endémica a México, se distribuye a través de la Sierra Madre Oriental y el Eje Neovolcánico Transversal, pasando desde Nuevo León a Oaxaca y el centro de Chiapas en el sureste de México (Canseco y Gutiérrez, 2010). *R. miotympanum* representa un modelo plausible para hacer estudios comparativos utilizando herramientas integrativas, debido a la variación morfológica que presentan. En este trabajo se busca identificar las variaciones bioacústicas, morfométricas y moleculares entre las diferentes unidades taxonómicas operacionales de *R. miotympanum* que se encuentran separadas por barreras geográficas (Sierra Madre Oriental y el Eje Neovolcánico Transversal) en otras regiones del centro de México.

4. Capítulo 1

Description of the advertisement call of *Rheohyla miotympanum* (Anura, Hylidae) from the Sierra Madre Oriental and Eje Neovolcánico Transversal with comments of the release call

Oscar A. Rayas Estrada^{1,3}; Oscar R. García Rubio¹ and Abel A. Batista Rodríguez²

¹Laboratorio de integridad Biótica, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México. E-mail: oarayas@hotmail.com. osrigaru@gmail.com

²Universidad de Chiriquí, Chiriquí, Panama. E-mail: abelbatista@hotmail.com

³Corresponding autor.

Abstract

Vocalization of anuran amphibians is one of the most important parameters in communication in social interaction and plays an important role in attracting females or aggressive competition of individuals or conspecific males. Advertisement calls of anurans are specie-specific and are a useful tool to identify and recognize cryptic species, which are morphologically undistinguished. *Rheohyla miotympanum* is an endemic Mexican hylid frog occurring in Sierra Madre Oriental in Mexico. It has great adaptations to arboreal habits. Males were recorded using a Tascam DR-40 digital recorder and a Marantz shotgun microphone less of 1 m of distance from the target. Temperature, relative humidity, perch distance, presence of other individuals and snout-vent length were measured. Temporal and spectral call structure were analyzed using Raven Pro 1.5 software. We analyzed 870 advertisement calls from 44 vocalizing males in four sites in Mexico. Also, we analyzed both temporal and spectral structure of the calls, using nine parameters. The advertisement call is formed by one to eight notes type A or B. *R. miotympanum* has a call rate of 0.32-0.48 calls/min, dominant frequency of 2872.68 Hz and call duration of 0.21sec. Likewise, we commented some points of the release call from a male in amplex. The data presented here suggests both temporal and spectral structure differences that indicated us could be a species complex, however, morphology, morphometrics and molecular data are needed.

Keywords: Mexico, Small-Eared Treefrog, call structure, vocalizations, advertisement call.

Introduction

Vocalization and other behavioral aspects are the primary modes of communication in social interaction in anuran amphibians (Gerhardt and Huber, 2002; Silva et al. 2016). Anurans' calls play an important role in their social context, like in sexual attraction, to advertising the position of an individual to conspecific males, to defending calling territories, or to announce a more aggressive behavior (Pinto et al. 2014). Advertisement calls of anurans males are species-specific recognition (Pinto et al. 2014), and has a mating function (Hepp et al. 2017). Additionally, have a great taxonomic significance to differentiate between species (Silva et al. 2016). The analysis of variations in acoustics signals is a useful tool to identify and describe cryptic species (Silva et al. 2016), mainly in anurans, which are morphologically undistinguished (Vacher et al. 2017). Bioacoustics studies are useful to elucidated boundaries between species, since variability in advertisement calls might be using as an indicator of taxonomic status (Kaya et al. 1999). The individual call repertoire variation, plasticity, and change over time might be underestimated, and knowledge on the effective signal space of individuals, populations or species might be of taxonomic relevance (Köhler et al. 2017). Likewise, comparative bioacoustics analyses of frog vocalizations are valuable tools in the discovery of new taxa, a rough estimate of taxonomic rank and species identification (Pinto et al. 2014). Furthermore, since the anurans are ectothermic animals, the calls that they emit could be influenced by the microclimate. For that reason, this factor should be considered in taxonomic comparisons between closely related species (Pinto et al. 2014).

On the other hand, *Rheohyla miotympanum* (Cope, 1863) was separated of the *Ecnomiohyla* genus, because their molecular differences (Batista et al., 2014), the

reproductive behavior (Duellman et al., 2016), and by lacking three morphological characters that characterize *Ecnomiohyla* genus (Faivovich et al., 2018).

R. miotympanum commonly known as small-eared treefrog, is an endemic Mexican hylid frog that occurs in parts of the Sierra Madre Oriental from Nuevo León and Coahuila to central Chiapas in Mexico (López et al. 2017), inhabiting in cloud forest at elevations from 1000 to 2800 m.a.l.s. (Duellman et al. 2016). The color pattern is highly variable; the dorsum varies from light green to green olive or brown. Duellman et al. (1970), reviewed recordings of individuals from south and north of Mexico, mentioning that the calls of this specie is highly variable between populations and he described as shorter monophasic or biphasic, poorly modulated notes. In this work, we recorded the advertisement call of *R. miotympanum* and analyzed the temporal and spectral structure of their calls, of several populations distribute through Sierra Madre Oriental to the Eje Neovolcánico Transversal, in Mexico. At the same time, we assessing the influence of weather parameters over calls features. In addition, we compared the call parameters with bioacoustics data of *Ecnomiohyla tuberculosa* analyzed by Ron et al. (2016). Finally, we presented a release call from a male during amplex.

Materials and methods

Study area

The study areas were located at four different sites in Mexico with different vegetation and climate. Pinal de Amoles, Querétaro (21°12'56.102"N, 99°32'26.941"W, 1297 m.a.l.s.) with a climate classified as semi-warm to mild (Aw, BS,hw and BS,kw) and receiving on average 1044 mm of precipitation per year (García, 1964). Maconi, Cadereyta de Montes, Querétaro (20°49'53.245"N, 99°31'37.052"W, 1655 m.a.l.s.) with a climate classified as warm (BS) and an average annual temperature of 20.5° C with 420.16 mm of precipitation per year

(García, 1964). Xilitla, San Luis Potosí (21°23'26.38"N, 98°59'53.966"W, 656 m.a.l.s.) with average annual temperature of 22° C and a mean annual precipitation of 2075.3 mm, their climate is classified as Am (García, 1964). Xalapa, Veracruz has a climate classified as mild to tropical with cloud forest and a mean annual temperature of 22.9° C and 2003.3 mm of precipitation (Aw) (García, 1964) (Fig. 1). All monitoring sites are located in an altitude gradient between 600 to 1800 m.a.l.s., and nearer to a permanent slow stream river.

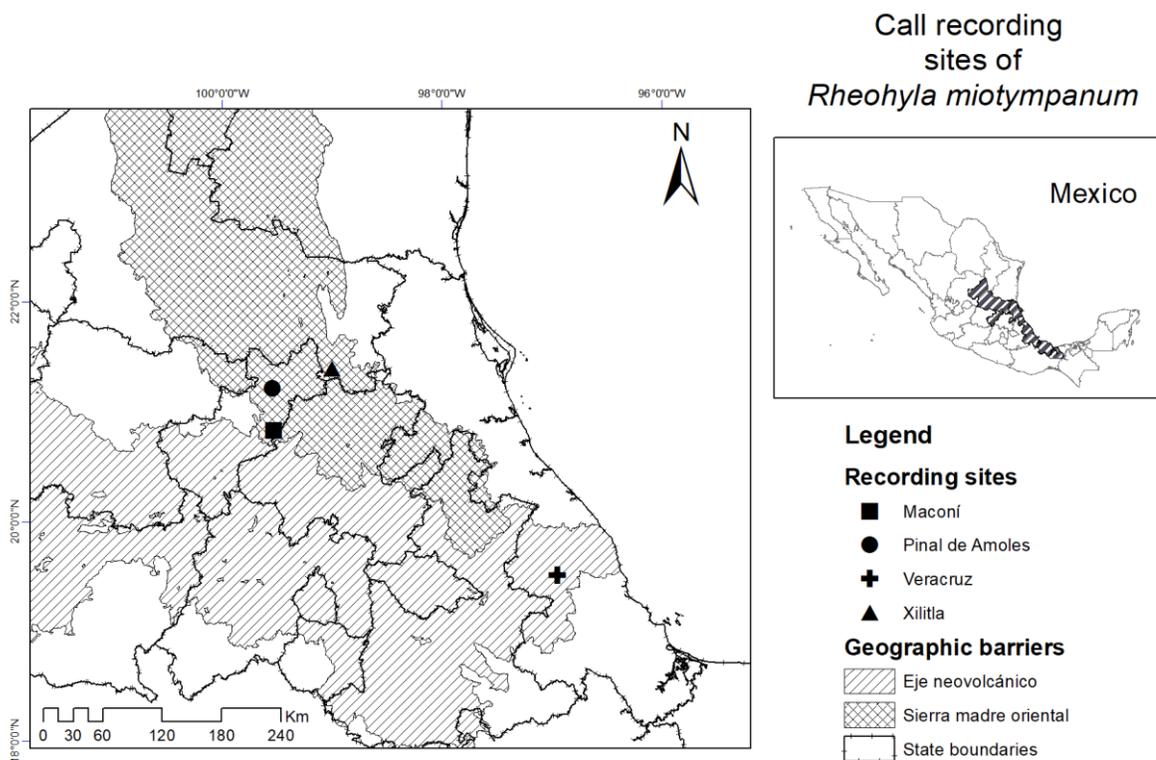


Figure 1. Recording sites of *Rheohyla miotympanum*.

Field work

Recordings of vocalizing males were conducted from March 2017 to March 2018 and took place between 7 p.m. and 2 a.m. We recorded at least 10 vocalizing individuals per site. Each recording had a minimum of 10 calls per minute. Calls were recorded with a Tascam DR-40 recorder with the next parameters: uncompromised WAV (wave) format, a resolution of 16 bits sampling rate, 44.1 kHz frequency range and

frequency response of 20 Hz-20,000 Hz; and a Marantz directional microphone SG-17P with a frequency response of 30-16,000 Hz, -33 dBV/pA sensibility and 200 Ω impedance. During all recordings, focal males were recorded less than 1 m distance from the microphone. Body size (snout-vent length, SVL) was measured using a digital Dogo tuls caliper (± 0.1 mm). Air temperature and relative humidity were measured at the time of recording using a Kestrel handheld weather and wind meter. Perch distance from water was measured using a Disto D8. Additionally, we registered the presence of other anurans (conspecific or heterospecific).

Bioacoustics analysis

Advertisement calls were analyzed with Raven Pro 1.5 64 bit version (Bioacoustics Research Program, 2018) with the next spectrogram parameters: Blackman window type, 512 window size, 70.1 overlap and 1024 DFT size. We analyzed both temporal and spectral structure of calls for all individuals according to Galvis et al. (2016) and Ron et al. (2016). We following the terminology suggested by Köhler et al. (2017): (1) call rate [(total number of calls-1)/time from beginning of first call to beginning of last call]; (2) Call duration (time from beginning to end of one call); (3) note duration (time from beginning to end of one note); (4) pulses per note (number of pulses found in one note); (5) call interval (time from the end of the call to the beginning of the next call); (6) dominant frequency (frequency in signal emitted containing the greatest energy); (7) low frequency (the lower frequency of the selection); (8) high frequency (the upper frequency of the selection) and (9) notes per call (number of notes per call). Oscilogram and spectrogram were generated using Raven Pro 1.5. Both recordings and voucher specimens were deposited at the Amphibian collection at Universidad Autónoma de Querétaro.

Statistical analysis

Relations in dominant frequency and SVL were conducted using linear regression. Differences in temporal and spectral structure due to the air temperature, relative humidity, perch distance and presence of other individuals were compared using

linear regression (Appendix 1). All tests were carried out using JMP 14.0 (SAS Institute Inc., www.sas.com). Mean values are accompanied by standard error.

Results

Calling males were vocalizing on the branches and some others on rocks, leaves or tree trunks, always close to the water (no more than 1 m long). During this study, no other anuran species were calling at the same time. *R. miotympanum* had a peak call activity at 11 p.m., and then calling activity decreased after this time. We registered at least one amplex in every study site; nevertheless, we found a higher proportion of males than females, suggesting that females had a habitat range higher than males, mainly above the trees. We analyzed 870 advertisement calls coming from 44 vocalizing males distributed between the four studied sites: 166 calls of 10 males from Pinal de Amoles, 279 calls of 11 males from Maconi, 194 calls of 10 males from Xalapa and 231 calls of 11 males from Xilitla.

Temperature and RH had no effect on the temporal and spectral call structure (Appendix 1). On the other hand, linear regression showed no positive relation between perch distance and presence of other individuals with the temporal and spectral structure. There is not any relation between SVL and dominant frequency (Appendix 1).

The advertisement calls are formed by two mainly notes (here called A and B). Note A is a dense harmonics no frequency modulated multipulsed note with components at frequencies above six kHz and a dominant frequency below three kHz, containing from four to 129 pulses, while note B is a dense harmonics no frequency modulated pulsed or multipulsed note showing from one to 13 pulses. As note A, the dominant frequency is below three kHz. These notes were assigned according their form, frequency and duration (Fig. 2). Advertisement calls started mainly with note A and continued by one to seven notes B; nevertheless, some advertisement calls began with note B continued by one or more notes B. However, most advertisement calls were formed only with note A (Table 1 and Fig. 2). *R. miotympanum* has a call rate of

0.32-0.48 calls/min, dominant frequency of 2872.68 Hz, 1-129 pulses per note, note duration of 0.08 sec and call duration of 0.21sec (Table 1).

On the other hand, we also registered five release calls from a male in amplex when other male was trying to catch the same female. These released calls were formed by one tonal - frequency modulated note to nine tonal – frequency modulated notes and three visible sparse harmonics (fig. 3). The note duration is about 0.032 sec, a dominant frequency of 1942.31 Hz, call duration of 0.39 sec, call interval of 0.57 sec and note interval of 0.27 sec.

Table 1. Advertisement call data for *R. miotympanum* ± Standard deviation and range (-)

Call rate (calls/min)	Call duration (sec)	Note duration (sec)	Pulses per note	Interval between calls (sec)	Dominant frequency (HZ)	Low frequency (Hz)	High frequency (Hz)	Notes per call (A,B)
0.32-0.48	0.21 ± 0.09 (0.15-0.27)	0.08 ± 0.05 (0.06-0.89)	20.25 (1-129)	2.87 ± 3.10	2872.68 ± 251.04	2037.66-2327.70	3167.34-3692.12	1-8

Finally, eggs and larval stages (including the last stage) were seen at each studied site in small ponds on the slow stream river in both rainy and dry season, suggesting this frog breeds all year. Also, we registered differences in call structured in both temporal and spectral parameters between each operational taxonomic unit (OTU). Dominant frequency, call duration and call interval showed differences in each studied site. The lowest dominant frequency was Maconi OTU with 2587.66 Hz (mean) and the highest dominant frequency was from Xilitla with 3089.72 Hz (mean). The lowest call duration was for Xilitla OTU with 0.15 sec (mean) and the highest call duration was for Maconi with 0.27 sec (mean). Veracruz had the highest number of pulses per note, with up of 103 pulses, while the other three OTUs showed less than 102 pulses per note. Also, there were differences in notes per call, pulses per note A and pulses per note B, mainly in Veracruz OTU respect to the other three OTUs.

Discussion

The specie *R. miotympanum* is the only one inside the *Rheohyla* genus. According to Batista et al. (2014) and Faivovich et al. (2018), *R. miotympanum* was separated of

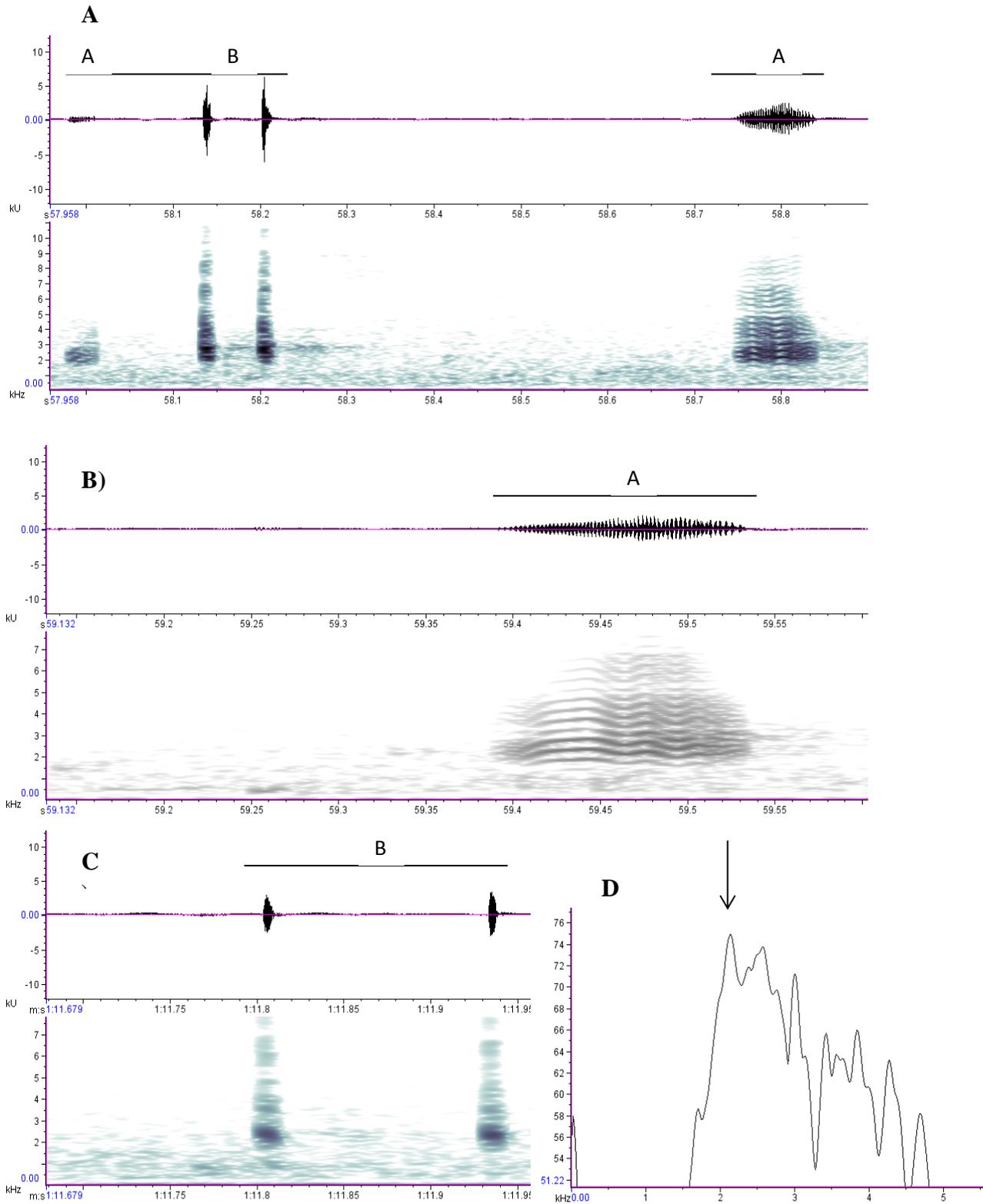


Figure 2. Oscilogram and spectrogram of *Rheohyla miotympanum* advertisement calls. A) Two advertisement calls. First call is formed by note A and two notes B (ABB) and second call formed by one note A; B) A closer view of second call formed by note A. Notice the dense harmonics and multipulsed note A; C) A closer view of part of first call showing notes B. D) Power spectrum of second call (see B)) (Temp. 23.4°C. SVL 29.21).

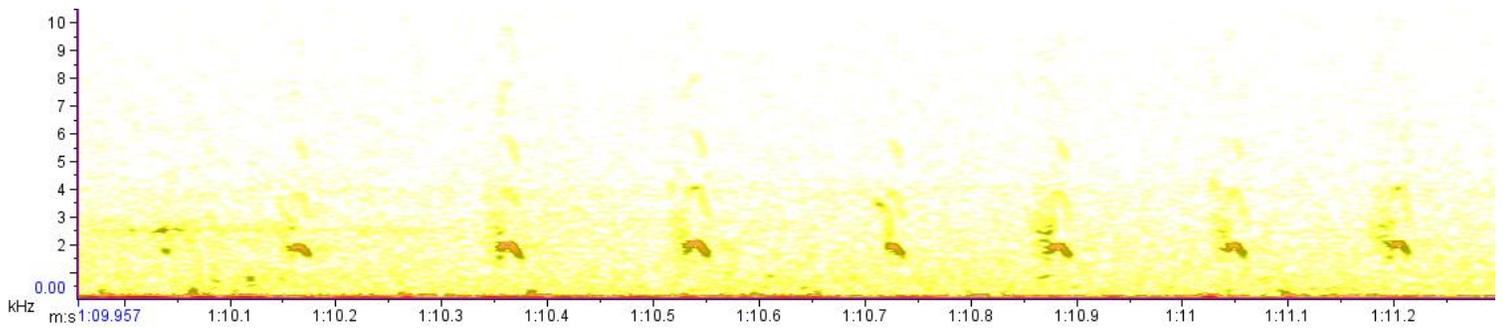


Figure 3. Spectrogram of the release call from a *Rheohyla miotympanum* male. Notice the tonal-frequency modulated notes and three visible sparse harmonics.

the *Ecnomiohyla* genus by ecological, molecular and morphological data and was taken by Duellman et al. (2016), who mentioned that is a monotypic specie. In our review, the data presented here agreed with Duellman (1970) showing short monophasic or diphasic notes in the advertisement call and mentioning that this calls are highly variable between OTUs, however, contrary to Duellman (1970) we reported that this call is formed by one or two no frequency modulated notes (A and B), while he indicated only one note poorly frequency modulated. Likewise, Duellman (1970) mentioned that the calls from Veracruz produced only one note per call, with a note duration from 0.18 to 0.40, contrary of our results, we found that frogs from Veracruz OTU produced calls formed by one or two notes, which had a note duration from 0.068 to 0.461 sec (table not shown), this could be because more recordings were analyzed for this work. On the other hand, Ron et al. (2016) reviewed the *Ecnomiohyla tuberculosa* systematics assessing their bioacoustics and other integrative tools. As result, *E. tuberculosa*, was moved to *Tepuihyla* genus, now *Tepuihyla tuberculosa*.

This specie has a dominant frequency between 562.5-632.8 Hz, call duration between 12.2-13.1 sec and 0.37 call rate, while *R. miotympanum* has a dominant frequency of 2587.66-3089.72 Hz, 0.15-0.27 sec call duration and 0.32-0.48 call rate. However, these values are consistent with those reported by Gerhardt and Huber (2002)

showing anurans with small size (*R. miotympanum* SVL 33.9 mm) calls at high frequencies, while large anuran calls at low frequencies (*E. tuberculosa* SVL 67 mm). On the other hand, Kaya et al. (1999), showed a positive correlation in temporal and spectral structure in the advertisement call of *Hyla arborea* and *Hyla savignyi* and air temperature. Nevertheless, our data suggest a negative correlation between calls structure and weather parameters; indicating that temperature and relative humidity did not influence *R. miotympanum* calls structure.

The advertisement call is composed of two notes (A and B) (see results). Note A is shorter in duration and number of pulses when the calls are formed by more than one note, while calls formed only with note A are larger and a high number of pulses are present. However, the acoustic diversity observed here, two different note types, were emitted in all cases (alone, conspecific or interspecific) by this frog, but we were not able to identify the function of this advertisement call. We could not register if it was emitted as an aggressive (antagonistic encounters) or a reproductive advertisement call. Hepp et al. (2017) identified the function of the advertisement call composed by three notes for *Scinax catharinae* species group.

On the other hand, as was mentioned, we found differences in both temporal and spectral structure of the advertisement call of *R. miotympanum*, mainly Veracruz OTU respect to Pinal de Amoles, Maconi and Xilitla OTU. For this work, this call can be formed by one to eight notes type A or B, starting mainly by note A. In this case, the advertisement call from Veracruz OTU showed the highest number of notes per call from one to eight notes, while the other three OTUs showed less notes per call, from one to six or seven notes. Dominant frequency, call interval and call duration were different, however, they were not significantly, agreed to Duellman (1970). Likewise, Veracruz OTU also showed the highest pulses per note A, until 129 pulses, while the other three OTUs showed less pulses, until 102 pulses as maximum. For note B, Veracruz OTU also showed the highest pulses per note, up of 12 pulses, while the other three OTUs showed less than 10 pulses per note B.

Hepp et al. (2017) mentioned that the use of the acoustic data is a good tool to unravel the taxonomy within many anuran groups. The acoustic differences found in this work between operational taxonomic units could indicate that this specie is actually a species complex and that the use of bioacoustics is a useful tool to resolve taxonomic issues in this group. In many frogs, speciation by strengthening of advertisement call differentiation has been demonstrated (Köhler et al. 2017). Also, the great external variation of morphology between individuals or operational taxonomic units indicated us that might be a species complex. Duellman (1970) reviewed all the hylid frogs of Middle America, mentioning that *R. miotympanum* (*Hyla miotympanum* in that time sinonimia) is a specie complex, mainly by morphological differences between populations. However, despite the differences described here, it is necessary to compare molecular, morphological and morphometrics features to a better understanding about this frog.

Finally, we presented and described here the advertisement call of the endemic frog *R. miotympanum* with supplementary information about release call. This release call presents a tonal-frequency modulated note, while the advertisement call showed no modulated frequency notes and higher dominant frequency than release call. This is the first time that release call is described for this anuran. The comparison of the calls between *E. tuberculosa* and between OTUs of *R. miotympanum* showed the divergence of this variable anuran studied here. We found eggs, larval stages and females in amplex in both dry and rainy season suggesting that this frog might breeds all year, however, a deeper survey will be performed to confirm this hypothesis.

Acknowledge

To the scholarship of the program of Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) that allow us to realize this work. To the field voluntaries that made a great job during field work in all the study areas. To Karla Zaldaña, Kevin Herroz, Mario Lugo, Belinda de la Cruz and all the people who helped in any event of this

work. To the Autonomous University of Queretaro, Mexico for all their support during this work.

References

Batista A, Hertz A, Mebert K, Köhler G, Lotzkat S, Ponce M, Vesely M. 2014. Two new fringe-limbed frogs of the genus *Ecnomiohyla* (Anura: Hylidae) from Panama, *Zootaxa*. 3826 (3): 449-474. Available from <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3826.3.2>

Bioacoustics Research Program. 2018. Raven Pro: interactive sound analysis software [Computer software]. (Version 1.5). Ithaca (NY): The Cornell Lab of Ornithology. Available from <http://www.birds.cornell.edu/raven>

Duellman, W. E. 1970. The Hylid Frogs of Middle America. Monograph of the Museum of Natural History. The University of Kansas. Vol. 1.427 pp.

Duellman WE, Marion AB, Hedges SB. 2016. Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). *Zootaxa*. 4104 (1): 001-109. Available from: <http://doi.org/10.11646/zootaxa.4104.1.1>

Faivovich J, Pereyra MO, Luna MC, Hertz A, Blotto BL. 2018. On the monophyly and relationships of several genera of *Hylini* (Anura: Hylidae: Hylinae), with comments on recent taxonomic changes in hylids. *South American Journal of Herpetology* 13(1): 1-32.

Galvis PA, Caorsi VZ, Pacheco SJ, Rada M. 2016. The advertisement calls of three *Eleutherodactylus* species from Hispaniola (Anura: Eleutherodactylidae). *Bioacoustics*. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/09524622.2016.1260053>

García, E. 1964. Modificaciones al Sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. No. 6. First edition. 98 pp.

Gerhardt HC y Huber F. 2002. Acoustic Communication in Insects and Anurans. The University of Chicago Press. 1-531.

Hepp, F, Laurencio AC y Pombal JP. 2017. Bioacoustics of four *Scinax* species and a review of acoustics traits in the *Scinax catharinae* species group (Amphibia: Anura: Hylidae). Salamandra 53(2), 212-230. Available online at <http://www.salamandra-journal.com>

Kaya U, Simmons AM. 1999. Advertisement calls of the tree frogs *Hyla arborea* and *Hyla savignyi* (Anura: Hylidae) in Turkey. Bioacoustics. 10:2-3, 175-190. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/09524622.1999.9753429>

Köhler J, Jansen M, Rodríguez A, Kok PJR, Toledo LF, Emmrich M, Glaw F, Haddad CFB, Rödel MO y Vences M. 2017. The use of bioacoustics in anuran taxonomy: theory, terminology, methods and recommendations for best practice. Zootaxa 4251 (1):001-124. Available online <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4251.1.1>

López JS, Comte AS, Pineda E, Corzas FG. 2017. *RHEOHYLA MIOTYMPANUM* (small-eared treefrog). ABNORMAL COLORATION. Herpetological Review. 48 (1): 169-170.

Ron SR, Venegas PJ, Andrade HM, Urrutia GG, Salerno PE. 2016. Systematics of *Ecnomiohyla tuberculosa* with the description of a new species and comments on the taxonomy of *Trachycephalus typhonius* (Anura, Hylidae). ZooKeys. 630: 115-154. Available from: DOI: 10.3897/zookeys.630.9298

Pinto JS, Mayerl CJ, Meilink WRM, Grasso D, Raaijmakers CCB, Russo VG, Segal M, Stegen G, Clegg J, Srikanthan AN, Glaw F, Vences M. 2014. Descriptions of the advertisement calls of three sympatric frog species in the subgenus *Vatomantis* (genus *Gephyromantis*) from Madagascar. *Herpetology Notes*. Volume 7:67-73.

Silva SL, Melo CC, Azevedo AT, Freitas MK, Silva L, Carvalho MN, Barbosa GJ. 2016. Acoustic characteristics of the advertisement call of *Dendropsophus elegans* (Anura: Hylidae). *Herpetology Notes*. Volume 9: 99-102.

Vacher LP, Kok PJR, Rodrigues MT, Lima JD, Lorenzini A, Martinez Q, Fallet M, Courtois EA, Blanc M, Gaucher P, Dewynter M, Jairam R, Ouboter P, Thébaud C, Fouquet A. 2017. Cryptic diversity in Amazonian frogs: integrative taxonomy of the genus *Anomaloglossus* (Amphibia: Anura: Aromobatidae) reveals a unique case of diversification within the Guiana Shield. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 112: 158-173. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2017.04.017>

5. Capítulo 2

Rheohyla orientalis (Amphibia; Anura; Hylidae), una especie nueva de la Sierra Madre Oriental

Oscar A. Rayas-Estrada¹, Oscar R. García-Rubio¹ y Fidel Landeros^{2,3}

¹Laboratorio de Integridad Biótica, Facultad de Ciencias Naturales, Campus Aeropuerto, Universidad Autónoma de Querétaro, Av. De las Ciencias s/n 76230, Juriquilla, Qro. México

²Licenciatura en Microbiología, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Av. De las Ciencias s/n 76230, Juriquilla, Qro. México

³Autor de correspondencia. landeros@uaq.mx

Resumen

El género *Rheohyla* fue descrito como monotípico, con sólo una especie conocida *R. miotympanum*, la cual es endémica de México con una distribución que va de Oaxaca hasta Tamaulipas. Estudiando especímenes de Veracruz, Querétaro y San Luis Potosí se determinó que hay diferencias morfológicas entre los especímenes de estos últimos dos Estados con los de Veracruz. Se secuenciaron dos genes mitocondriales 16S y Citocromo b para determinar la variación genética. Los especímenes de Querétaro y San Luis Potosí difieren en 4.7% para 16S, 9% para Cytb y más del 12% para COI en sus secuencias con respecto a los especímenes de Veracruz. Se describe y discute *Rheohyla orientalis* como una nueva especie de la Sierra Madre Oriental.

Palabras clave: *Rheohyla*, variación genética, morfología, Sierra Madre Oriental, genes

Abstract

The genus *Rheohyla* was described as monotypic, with one known specie *R. miotympanum*, which is endemic to Mexico habiting from Oaxaca to Tamaulipas. We analyzed individuals from Veracruz, Queretaro and San Luis Potosi. We determined morphological differences between individuals of the last states (Queretaro and San Luis

Potosi) respect to individuals from Veracruz. Two mitochondrial genes 16S and Cytochrome b were sequenced to determine the genetic variance. Individuals from Queretaro and San Luis Potosi differed at least in 6% in their sequences respect to individuals from Veracruz. We described *Rheohyla orientalis* as new specie from Sierra Madre Oriental.

Key words: *Rheohyla*, genetic variation, morphology, Sierra Madre Oriental, genes

Introducción

Cope (1863) describió a *Hyla miotympanum* (Anura; Hylidae) como una nueva especie con especímenes colectados cerca de Xalapa, Veracruz, basándose principalmente en el tamaño minúsculo de su tímpano. Faivovich et al. (2005) con base en un estudio con secuencias nucleares y mitocondriales transfirieron la especie a un nuevo género que ellos mismo propusieron, *Ecnomiohyla*. Por su parte, Batista et al. (2014) evidenciaron que *E. miotympanum* formaba el taxón hermano de todas las especies de ese género usando secuencias del gen mitocondrial 16S. Finalmente, Duellman et al. (2016) la transfirieron a un nuevo género, *Rheohyla*, debido a que *Ecnomiohyla* se caracteriza por tener flecos dérmicos festoneados sobre el margen externo del pie y del antebrazo, discos digitales terminales largos, y prepolices largos en machos (Faivovich et al. 2018), características que no están presentes en los especímenes de *R. miotympanum* (Faivovich et al. 2018).

Actualmente, *R. miotympanum* es considerada como monotípica, que distribuye desde Oaxaca hasta Tamaulipas. Cervantes-Serna (2015) desarrolló un estudio de la distribución actual y potencial de esta especie en México, resultando que es endémica del México, distribuida principalmente en la costa este del país, desde la Sierra de Oaxaca hasta la Sierra Madre Oriental de Tamaulipas.

Como en muchos otros organismos, en las últimas tres décadas se ha incrementado el descubrimiento y descripción de nuevas especies de anfibios combinando caracteres morfológicos y de biología molecular (Rakotoarison et al. 2017). Los métodos tradicionales en combinación con caracteres moleculares y fenotípicos (morfometría y morfología) ha incrementado el conocimiento de los límites entre especies, principalmente

en grupos que muestran alta diversidad críptica, como los anfibios, que son por lo menos superficialmente indistinguibles morfológicamente (Vacher et al. 2017). Las técnicas moleculares y el uso del código de barras del ADN para el proceso de identificación de entidades biológicas forman parte de una integración real del conocimiento para incrementar métodos teóricos y prácticos (Mazzamuto et al. 2016).

El objetivo del presente trabajo es describir una nueva especie de *Rheohyla*, que se distribuye en la Sierra Madre Oriental, con base en características morfológicas, morfométricas y secuencias de dos genes mitocondriales (16S y Cytb).

Materiales y métodos

Localidades

Los especímenes fueron estudiados de tres localidades de la Sierra Madre Occidental con diferente clima y vegetación. 1) Maconi, municipio de Cadereyta de Montes (Querétaro) ($20^{\circ}49'53.245''N$ y $99^{\circ}31'37.052''O$, 1655 msnm) con un clima clasificado como BS que corresponde a clima de estepa seco con una temperatura media anual de $22^{\circ}C$ y con precipitación anual media mayor a 36 mm (García, 1964) y matorral xerófilo como tipo de vegetación (Zamudio et al. 1992); 2) Pinal de Amoles, municipio de Pinal de Amoles (Querétaro) ($21^{\circ}12'56.102''N$ y $99^{\circ}32'26.941''O$, 1297 msnm), con bosque tropical caducifolio alternándose con matorral xerófilo y bosque de pino-encino (Zamudio et al. 1992) con un clima de tipo Aw, BS,hw y BS,kw (García, 1964) que corresponde a clima de sabana y estepario con una temperatura media anual de $18^{\circ}C$ y una precipitación anual de 500 a 1100 mm (Zamudio et al. 1992) y 3) Xilitla, municipio de Xilitla (San Luis Potosí) ($21^{\circ}23'26.38''N$ y $98^{\circ}59'53.966''O$, 656 msnm), con clima Am (García, 1964) correspondiente a clima tropical lluvioso con un promedio de temperatura anual de $22^{\circ}C$ y arriba de 1800 mm de precipitación anual (Martínez et al. 2014) y tipo de vegetación predominante el bosque de niebla (Martínez et al. 2014) (Fig. 1). Las coordenadas geográficas y elevaciones fueron tomadas con un GPS Garmin eTrex 10 en grados decimales.

Debido a que *R. miotympanum* fue descrita de los alrededores de Xalapa (Veracruz), se tomaron muestras de especímenes del Jardín Botánico Francisco Javier Clavijero (19°30'39.389"N y 96°56'36.273"O, 1333 msnm) como referencia de la especie y punto de comparación de la misma.

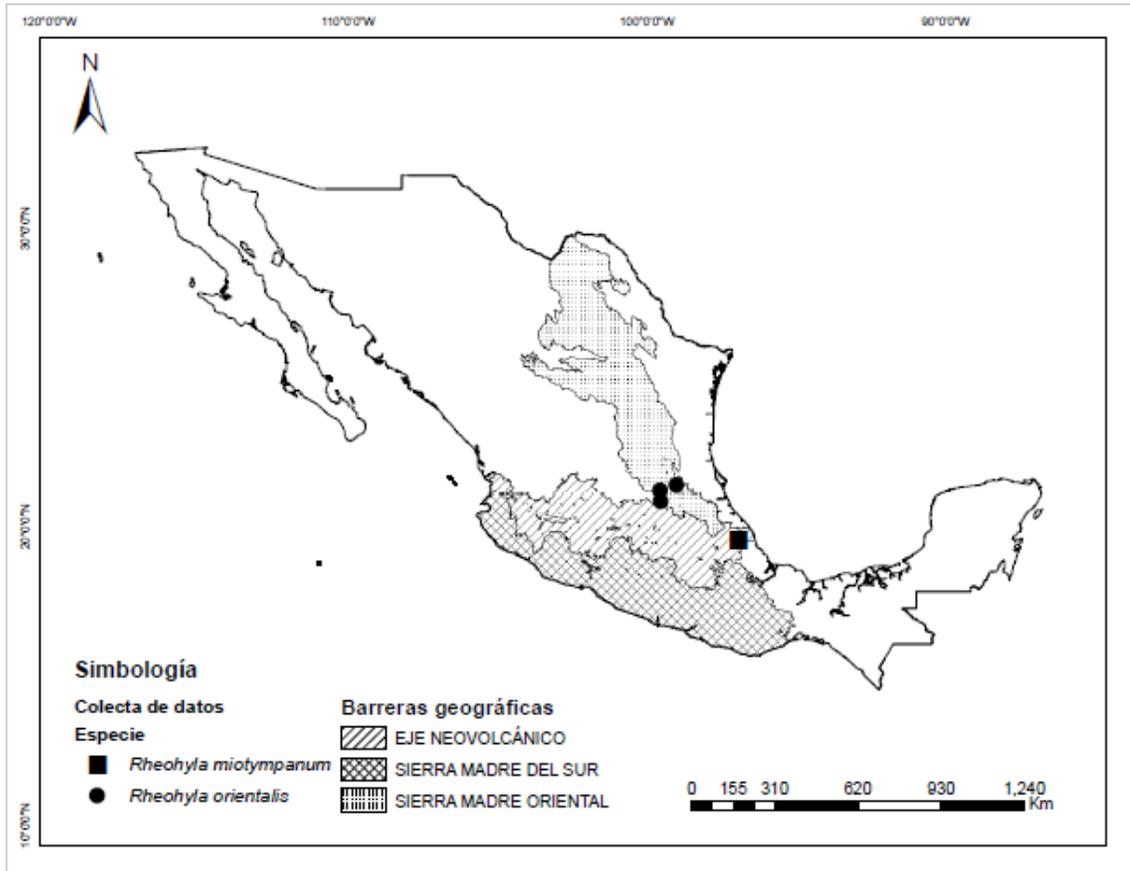


Figura 1. Áreas de estudio

Toma de datos morfométricos y morfológicos

Se tomaron medidas de 30 individuos de cada localidad. Se usaron las variables morfométricas propuestas por Orrico et al. (2017): (1) Longitud hocico-cloaca (LHC); (2) diámetro del tímpano (DT). Dos variables propuestas por Pinto et al. (2014); (3) longitud del antebrazo (LAB) y (4) longitud de la mano (LM); y (5) longitud total del fémur (LTF) propuesta por Ron et al. (2016). Adicionalmente se midió la (6) longitud del brazo (LB) desde el inicio hasta el final del humero.

El sexo se determinó por la presencia de almohadillas nupciales, tamaño, hendiduras vocales y vocalizaciones. La morfología y descripción de la coloración en vida están basadas en fotografías digitales tomadas con ayuda de una cámara profesional Canon EOS Rebel T3i. La toma de mediciones se hizo con un vernier digital Dogo tuls con un error de 0.1 mm. Los datos morfométricos obtenidos fueron corregidos de acuerdo a la longitud total del anfibio. Los caracteres morfológicos se siguieron de acuerdo a Savage (2002) y Duellman (1970); y la fórmula de la membrana de dedos y pies de acuerdo a Savage (2002).

Resguardo de los especímenes

Se colectaron tres individuos por cada sitio de estudio. Los individuos fueron eutanasiados por medio de anestesia inhalada (Sofloran Vet). Se colocaron en un frasco con etanol al 70% con los datos de colecta (fecha, hora, lugar de colecta, colector y especie) y guardado a temperatura ambiente hasta su utilización para la extracción de ADN. Los especímenes fueron depositados en la colección biológica de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ).

Extracción de ADN y amplificación por PCR

Las muestras de ADN fueron obtenidas a partir del hígado de los individuos preservados usando el kit DNeasy Blood & Tissue de Qiagen para extracción y purificación de ADN. Se siguió el protocolo correspondiente al kit con la modificación en el primer punto donde las muestras fueron molidas con nitrógeno líquido para facilitar la lisis. Las muestras de ADN fueron guardadas a -20°C para su posterior uso. Se usaron fragmentos de tres genes mitocondriales, el 16S, Citocromo b (Cytb) y Citocromo Oxidasa I (COI). El gen 16S mitocondrial fue amplificado usando los cebadores L2510 como forward y H3056 como reverse (Batista et al. 2014); para el gen Cytb como forward MVZ15 y reverse H15149 (Moen y Wiens 2008) y para el gen COI como forward COX y reverse COY (Moen y Wiens 2008).

Todos los PCR se llevaron a cabo en un Termo Ciclador T100 de BIO RAD usando las siguientes condiciones: Un fragmento del 16S se amplificó usando una temperatura inicial

de desnaturalización de 95°C por 5 min, seguido por 35 pasos de desnaturalización a 94°C por 30 seg, hibridación a 50.9°C por 30 seg para 16S (42 °C para Cytb), elongación por 1.45 min para 16S (1.30 min para Cytb) a 72°C y una extensión final por 5 min a 72°C.

Secuenciación

Las muestras producto del PCR fueron enviados para su secuenciación en el Laboratorio de Servicios Genómicos (LANGEBIO) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional.

Análisis filogenético

La edición de las secuencias se realizó en el programa Chromas 2.1.8 (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane QLD, Australia). El alineamiento y la concatenación de las secuencias se llevó a cabo en el programa MacClade 4.0 (Maddison & Maddison, 2000), eliminando las regiones ambiguas.

La construcción del árbol se hizo usando el principio bayesiano, con el programa MrBayes v3.2.5 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Se usaron los siguientes parámetros model= GTR, rates= invgamma, ngen= 1,000,000, nruns=4, samplefreq= 100 y se quemaron el 50% de las generaciones.

Descripción

Rheohyla orientalis sp. nov. Rayas-Estrada, García-Rubio & Landeros

Zoobank:

Diagnosis. Rana de tamaño pequeño a moderado llegando a pasar los 3 cm de longitud de Hocico-Cloaca (LHC) (2.7-3.2 cm) en machos. Las membranas de las manos son extendidas y corresponde a la formula IO-1_{1/4}II0-1_{1/4}III0-1V, mientras que las membranas de los pies son completas, tocando la base del disco de cada falange de cada dígito. Presenta un tubérculo metatarsal interno grande y extendido hacia la parte interna. Sin borde blanco dorsolateral o si está presente, es una banda delgada y bordeada de una banda ancha café. *R. miotympanum* difiere de *R. orientalis* por tener un tubérculo metatarsal

ovoide, reducido, aplanado y no extendido, por presentar un borde blanco ancho desde el labio de la maxila superior hasta casi la unión de la cintura pélvica, así como por las membranas de manos y pies que en ambos casos son extendidas. *R. orientalis* presenta una apertura anal en forma de “U” abierta hacia los lados con un borde blanco arriba no mayor a 1 mm de distancia, mientras que *R. miotympanum* presenta una apertura anal transversal sin forma de “U” con un borde blanco arriba con más de 1 mm de distancia. La figura 2 muestra los caracteres antes mencionados.

Etimología. El nombre *orientalis* hace referencia a la distribución restringida de la especie a la Sierra Madre Oriental, siendo separada por el Eje Neovolcánico Transversal.

Descripción. Es una rana de color variable, de verde, verde oliva a café con manchas irregulares oscuras que sobresalen del color dorsal. Vientre y saco vocal granuloso color blanco a crema granuloso y con los flancos de las extremidades amarillas (Fig. 3). Color en preservado gris con manchas irregulares oscuras sobre el dorso. Pupila horizontal y con membrana no reticulada. Nostrilos verticales. Saco vocal sencillo (mediano) subgular. Contornos dorsales de la cabeza redondeados. Perfil del hocico obtuso. Folder supratimpánico que se extiende desde el ojo hacia la axila. Dorso liso. Sin disco ventral. Almohadillas nupciales café sin espinas ni estructuras extendidas. Posición de la cloaca arriba con la abertura anal con un borde no mayor a 1 mm de distancia de color blanco. Sin línea o borde blanco dorso-lateral. Folder tarsal desde el metatarso interior que se extiende hacia el final del tarso. Tubérculo metatarsal interno grande y extendido hacia la parte interna en cada extremidad anterior. Dientes vomerianos transversales entre las dos coanas. Menos de 10 dientes vomerianos. Hendiduras vocales presentes (una a cada lado). Lengua con estructura en forma de sierra irregular en la parte anterior. Los 5 dígitos del pie completamente con membrana, tocando la base del disco de la falange de cada dígito. Dedo IV del pie más largo que el resto (1<II<III<IV>V). Por lo menos un tubérculo subarticular en cada dígito. Tubérculos supernumerarios pequeños pero distinguibles. Discos de los dedos de los pies expandidos redondos con almohadillas ovoides, tubérculos digitales en línea externa ovoide y perfil globular. Mano con cuatro dígitos con membrana

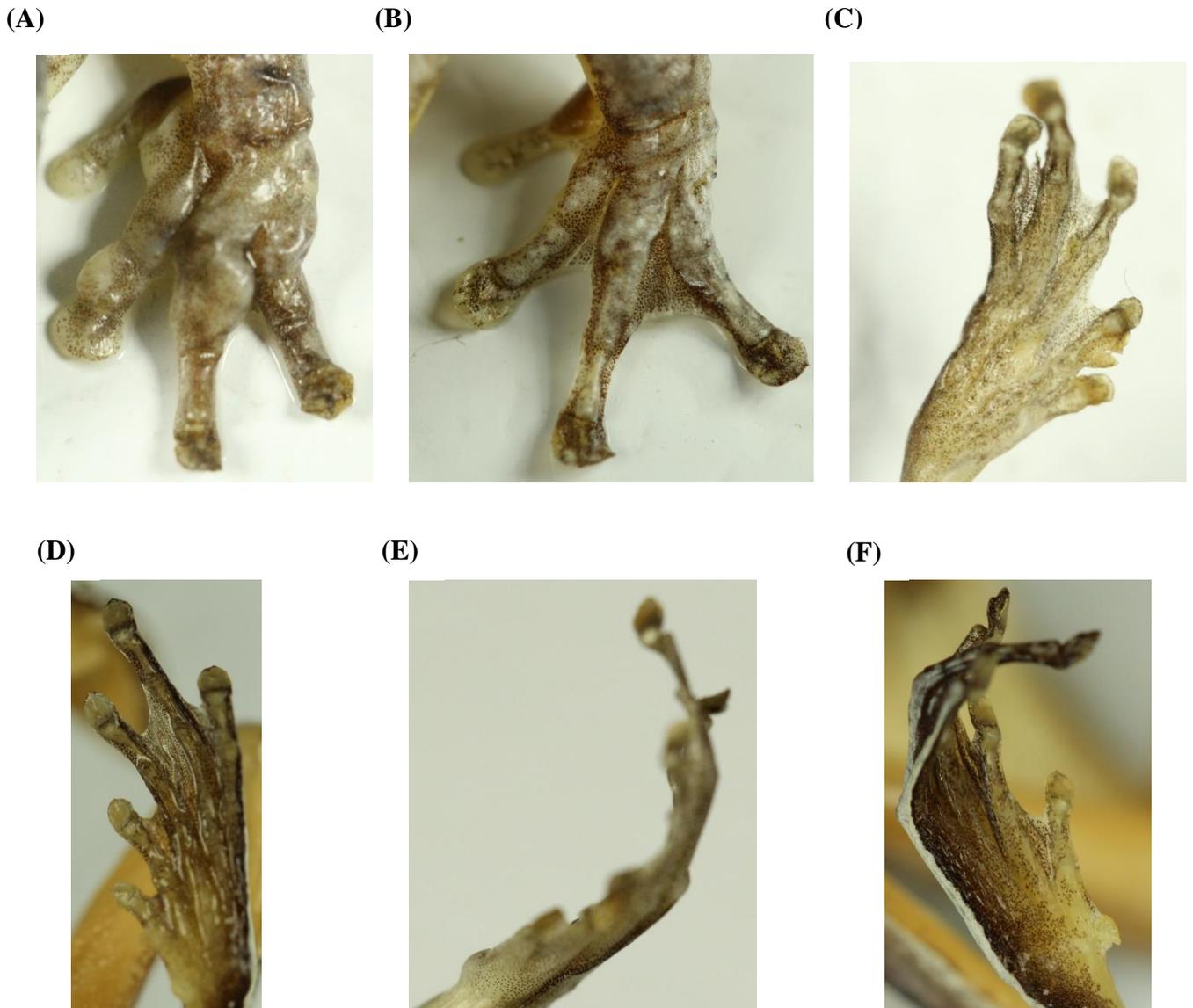


Figura 2. Acercamiento visual de los caracteres morfológicos de *R. miotympanum* y *R. orientalis* sp. nov. (A) Acercamiento de la extremidad anterior izquierda de *R. miotympanum*; (B) acercamiento de la extremidad anterior izquierda de *R. orientalis*; (C) extremidad posterior de *R. miotympanum*; (D) extremidad posterior de *R. orientalis*; (E) extremidad posterior de *R. miotympanum* mostrando el tubérculo metatarsal interno ovoide y no extendido hacia afuera; (F) extremidad posterior de *R. orientalis* mostrando tubérculo metatarsal interno más grande y extendido hacia afuera; (G) vista dorsolateral de *R. miotympanum* mostrando línea blanca hasta la unión de las ingles; (H) vista dorsolateral de *R. orientalis*; (I) acercamiento de la cloaca de *R. miotympanum*, nótese el inicio del borde blanco más distanciado de la parte anterior de la membrana que cubre el ano; (J) acercamiento de la cloaca de *R. orientalis*, nótese el borde blanco casi en unión al borde anterior.

(G)



(H)



(I)



(J)



Figura 2. continuación. Acercamiento visual de los caracteres morfológicos de *R. miotympanum* y *R. orientalis* sp. nov. (A) Acercamiento de la extremidad anterior izquierda de *R. miotympanum*; (B) acercamiento de la extremidad anterior izquierda de *R. orientalis*; (C) extremidad posterior de *R. miotympanum*; (D) extremidad posterior de *R. orientalis*; (E) extremidad posterior de *R. miotympanum* mostrando el tubérculo metatarsal interno ovoide y no extendido hacia afuera; (F) extremidad posterior de *R. orientalis* mostrando tubérculo metatarsal interno más grande y extendido hacia afuera; (G) vista dorsolateral de *R. miotympanum* mostrando línea blanca hasta la unión de las ingles; (H) vista dorsolateral de *R. orientalis*; (I) acercamiento de la cloaca de *R. miotympanum*, nótese el inicio del borde blanco más distanciado de la parte anterior de la membrana que cubre el ano; (J) acercamiento de la cloaca de *R. orientalis*, nótese el borde blanco casi en unión al borde anterior.

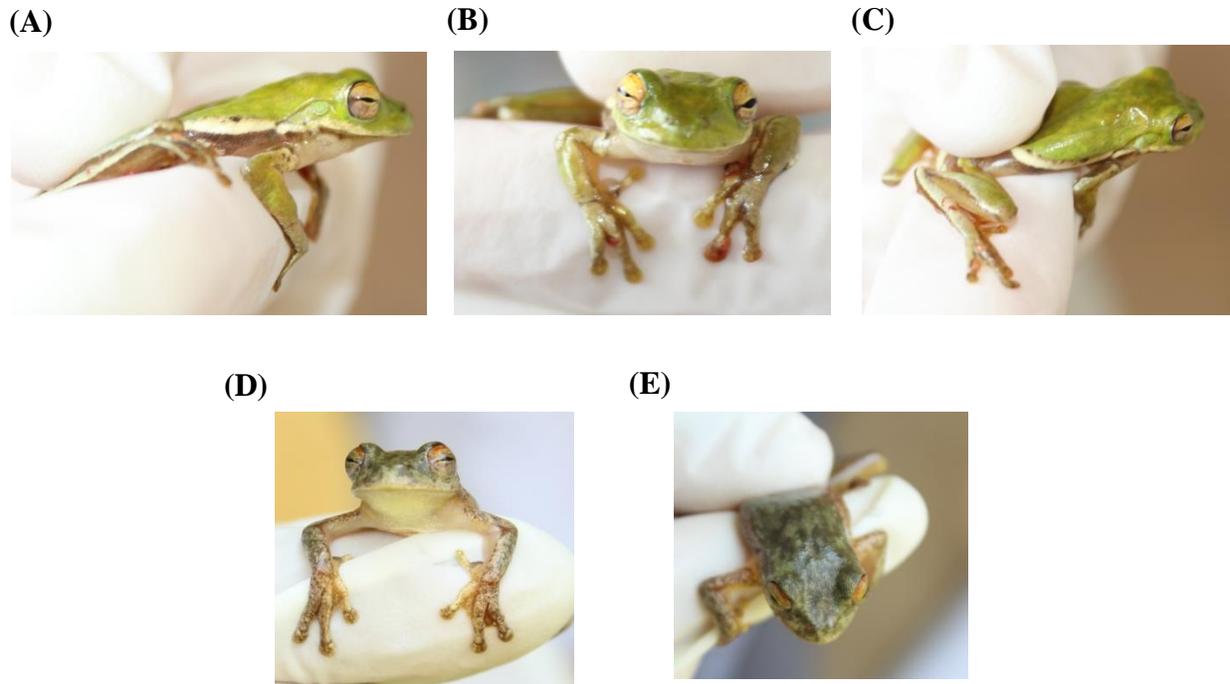


Figura 3. Vista dorso-lateral, dorsal, ojos y manos en vida de *R. miotympanum* y *R. orientalis* sp. nov. (A-C) *R. miotympanum* de Xalapa, Veracruz; (D-E) *R. orientalis* sp. nov. de Xilitla, San Luis Potosí. (A) Vista dorso-lateral, nótese la línea blanca desde la mandíbula superior hasta casi la cintura pectoral; (B) Vista de ojos y manos; (C) vista dorsal; (D) Vista de ojos y manos, nótese las almohadillas nupciales en el dedo I de ambos lados; (E) vista dorsal.

extendida con la siguiente formula: $I0-1\frac{1}{4}II0-1\frac{1}{4}III0-1V$. Dígito III de la mano más largo que el resto ($I < II < III > IV$). Diámetro del disco del dedo III de la mano igual al diámetro del tímpano. Discos de los dígitos de la mano extendidos redondos, con almohadillas ovoides, tubérculos digitales en línea externa ovoide aplanado y perfil globular. Tubérculo palmar bífido en algunos individuos. Por lo menos un tubérculo subarticular en cada dígito de la mano. Sin cresta craneal. Rango de tamaño pequeño a moderado de 27 hasta 32 mm de longitud de hocico-cloaca (LHC). Rango del diámetro del tímpano (DT) de 1.26 a 1.76 mm. La longitud total del fémur (LTF) de 10.26 a 14.53 mm (mayor que *R. miotympanum*), longitud del brazo (LB) de 5.34 a 6.74 mm, longitud de la mano (LM) de

6.73 a 8.03 mm y longitud del antebrazo (LAB) de 5.87 a 6.95 mm. Iris bronce pálido con retículas negras, a veces con un margen superior rojo-anaranjado en algunos individuos. Folder en el margen exterior del antebrazo que recorre desde antes de la muñeca hasta la unión con el brazo. Presencia de dimorfismo sexual en donde las hembras son de tamaño moderado pasando los 50 mm de longitud hocico-cloaca. Los huevos son depositados en plantas o rocas cercanas a la orilla del río. Están envueltos en una masa gelatinosa y son de color café. Las larvas son de color negro, sin embargo, su descripción aún no ha sido llevada a cabo.

Resumen taxonómico

Hábitat. Matorral Xerófilo en donde rara vez las especies sobrepasan los cuatro metros de alto, matorral submontano, bosque secundario, bosque tropical caducifolio, bosque de pino-encino y bosque nuboso. Desde los 600 msnm hasta 1800 msnm. Siempre asociados a cuerpos de agua permanentes con corrientes lentas en donde depositan los huevos. Los machos se ven activos durante la noche vocalizando siempre sobre las hojas y troncos cercanos al agua. Con clima seco estepario (BS) hasta clima tropical lluvioso (Am). La temperatura en los sitios es muy variable siendo 22°C la temperatura anual promedio. La precipitación anual media varía de los 300 mm hasta arriba de los 1800 mm.

Material estudiado. México: San Luis Potosí: municipio de Xilitla, cerca de la cascada la cebolla (21°23'27.064"N y 98°59'54.243"O, 628.52 msnm), muy cercano a las pozas de Edward James, 6 de diciembre 2017 a las 21:35 hrs, K. Zaldaña y O. Rayas Xi3 (UAQ Holotipo), ibídem, 7 de diciembre 2017 a las 20:46 hrs, K. Zaldaña y O. Rayas Xi1 (UAQ), ibídem, 7 de diciembre 2017 a las 21:12 hrs, K. Zaldaña y O. Rayas Xi2 (UAQ); México: Querétaro: municipio de Pinal de Amoles, a las orillas del río de la cascada de Chuveje (21°9'49.687"N y 99°33'32.047"O, 1337.68 msnm), el 8 de noviembre 2018 a las 19:20 hrs, M. Lugo y O. Rayas Ch15 (UAQ), ibídem, 29 de marzo 2017 a las 00:10 hrs, K. Zaldaña y O. Rayas Ch2 (UAQ), ibídem, 30 de marzo 2017, K. Zaldaña y O. Rayas Ch6 (UAQ); México: Querétaro: municipio de Cadereyta de Montes, localidad de Maconi, comunidad de Solares, a la orilla del río de la cascada El Caracol (20°50'43.145"N y 99°32'21.988"O, 1674.07 msnm), 11 de octubre 2017 a las 23:27 hrs, K. Zaldaña y O.

Rayas Ma3 (UAQ), ibídem, 11 de octubre 2017 a las 23:24 hrs, K. Zaldaña y O. Rayas Ma8 (UAQ), ibídem, 11 de octubre 2017 a las 00:34 hrs, K. Zaldaña y O. Rayas Ma11 (UAQ). Otros materiales estudiados: *Rheohyla miotympanum*: México: Veracruz: municipio de Xalapa, dentro del jardín botánico Francisco Javier Clavijero (19°30'44.748"N y 96°56'37.449"O, 1333 msnm), 2 de noviembre 2017 a las 21:59 hrs, K. Zaldaña y O. Rayas Ve3 (UAQ), ibídem, 2 de noviembre 2017 a las 22:26 hrs, K. Zaldaña y O. Rayas Ve4 (UAQ), ibídem, 2 de noviembre 2017 a las 23:25 hrs, K. Zaldaña y O. Rayas Ve11 (UAQ).

Comentarios taxonómicos.

Los especímenes presentados fueron comparados con las descripciones hechas por Cope (1863) y Duellman (1970), así como análisis personal de especímenes colectados en Xalapa, Veracruz. Cope (1863) menciona como característica diagnóstica las membranas extendidas de los pies para los especímenes de Veracruz, revisando los especímenes colectados, los pies presentan membranas extendidas, tocando por lo menos la base del disco de dos dígitos pero no de todos los dedos del pie, mientras que *R. orientalis* presenta membranas completas tocando la base del disco de todos los dígitos. Así mismo, Cope (1863) menciona la presencia de una línea o borde blanco-amarillento que corre desde el labio de la maxila superior hasta casi la ingle dorso-lateralmente, mientras que *R. orientalis*, no presenta dicho carácter (en vivo o preservado) pero si puede o no presentar rara vez en algunos individuos un borde café en la parte lateral del dorso con un borde delgado blanco arriba, casi en la unión con el dorso, no extendiéndose desde la maxila como en *R. miotympanum*. Por su parte, Duellman (1970) basándose en la descripción y colecta de Cope (1863) llevo a cabo un análisis usando muestras de diferentes estados de la Republica (Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Puebla, Veracruz y Chiapas) por lo que la diagnosis y descripción corresponden para *R. miotympanum* y la nueva especie *R. orientalis*. Duellman (1970) menciona el patrón de coloración del iris para los ejemplares de Veracruz siendo la parte superior del iris de un color bronce rojizo y en la parte baja un bronce pálido amarillento, sin embargo, *R. orientalis* también presenta en algunos individuos un color bronce rojizo en la parte superior del iris e incluso algunos individuos

de *R. miotympanum* carecen del bronce rojizo en la parte superior del iris, por lo que para este trabajo no forma parte de un carácter diagnóstico.

Por otro lado, es necesario llevar a cabo estudios y análisis en renacuajos de *R. orientalis* para identificar caracteres taxonómicos durante su etapa larvaria. Finalmente, el árbol filogenético generado para este trabajo nos indica una variación genética alta del 4.7% para el 16S, 9% para Cytb y más del 12% para COI (Fig. 4), lo que nos indica la separación y el surgimiento de la nueva especie *R. orientalis*, de acuerdo a Orrico et al. (2017) donde menciona que una distancia genética alta se toma cuando $\geq 3\%$ para 16S, ND1, POMC y RAG-1; y $\geq 10\%$ para COI. Así mismo, tiene una variación genética del 8.8% usando los tres genes mitocondriales (Fig. 5). Diversos estudios demuestran la utilización de estos parámetros en la identificación de especies de anfibios y otros grupos (Orrico et al. 2017). El clado de Veracruz corresponde a la especie ya descrita como *R. miotympanum* mientras que el clado agrupando a Puebla, San Luis Potosí y Querétaro corresponde a la nueva especie aquí descrita. El porcentaje de cambios de bases corresponde a 0.1, es decir, 10%, de variación genética. Por otra parte, la secuencia del espécimen de Puebla fue descargada de GenBank y etiquetada con el nombre de la otra especie debido a que así se encontraba etiquetada en el GenBank (Fig. 4), sin embargo, de acuerdo a los alineamientos generados para este trabajo, en realidad se trata de la especie *R. orientalis*. Finalmente, el aislamiento de las poblaciones (Fig. 1) debido a la aparición de separaciones geográficas marcadas (barreras geográficas), en este caso la Sierra Madre Oriental y el Eje Neovolcánico Transversal, implica el surgimiento alopátrico de una nueva especie (Cortés et al. 2015). El aislamiento reproductivo o los caracteres aparecen después de la aparición de alguna barrera que divida la distribución geográfica de una especie, impidiendo el flujo génico y permitiendo que las poblaciones diverjan por deriva génica o selección natural (Cortés et al. 2015). Para este trabajo, las barreras presentes posiblemente jueguen un papel muy importante para el surgimiento de esta nueva especie, ya que, la distribución de *R. orientalis* la encontramos en la Sierra Madre Oriental, al borde con el Eje Neovolcánico Transversal en donde encontramos a *R. miotympanum* (Fig. 1). Así mismo, de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, la especie catalogada como *R. miotympanum* para los estados de Oaxaca y Chiapas, posiblemente se trate de otro complejo de especies,

debido al aislamiento geográfico que pudieran tener sus poblaciones por la Sierra Madre del Sur (Fig. 1).

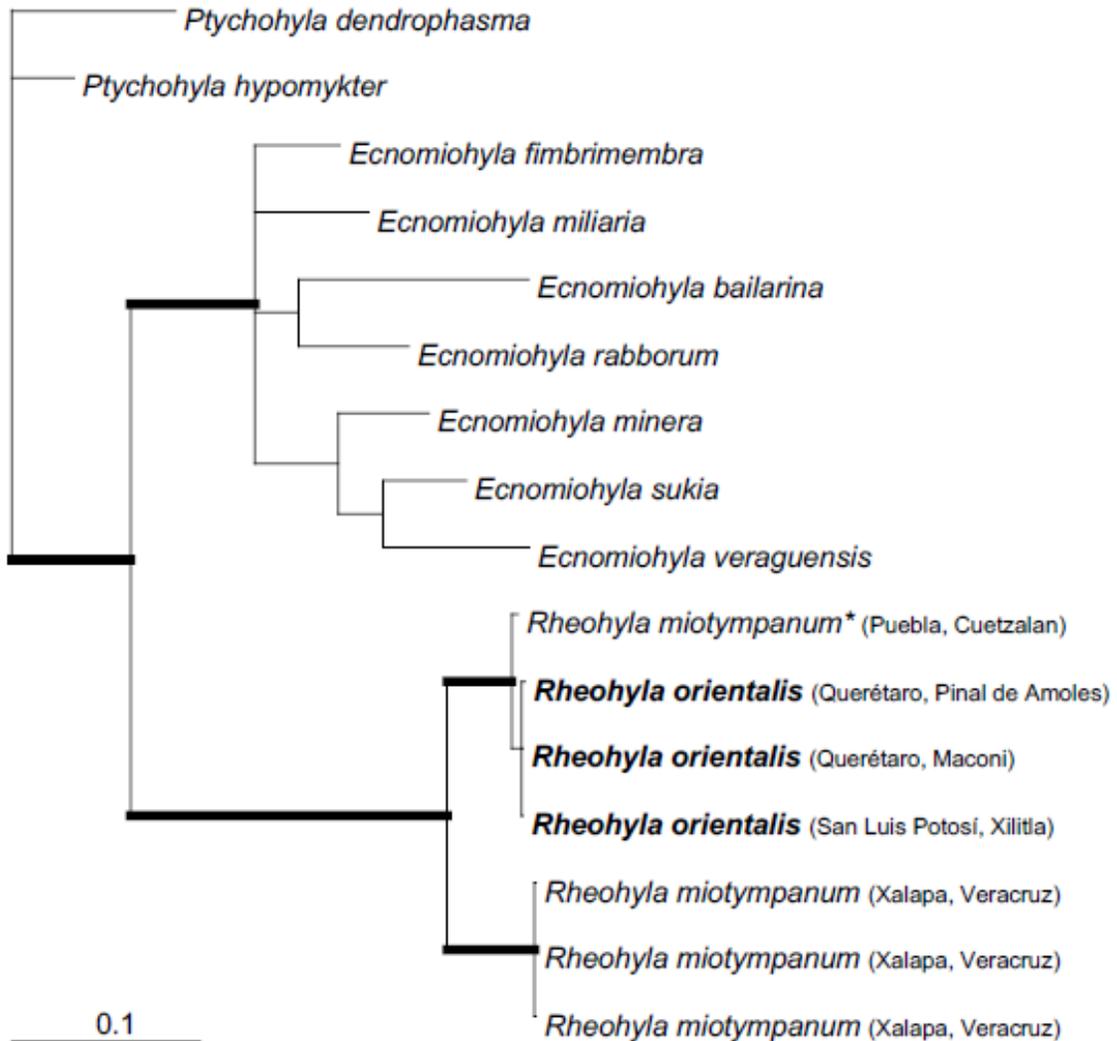


Figura 4. Posición filogenética de *Rheohyla orientalis* usando 16S y Cytb. Las ramas gruesas representan más de un 90% de probabilidades posteriores bayesianas. La barra representa el porcentaje de cambios en pares de bases, donde 0.1= 10% *Esta secuencia se bajó del GenBank por lo que esta etiquetada como *R. miotympanum* debido a que así está catalogada en GenBank, sin embargo, corresponde a *R. orientalis*.

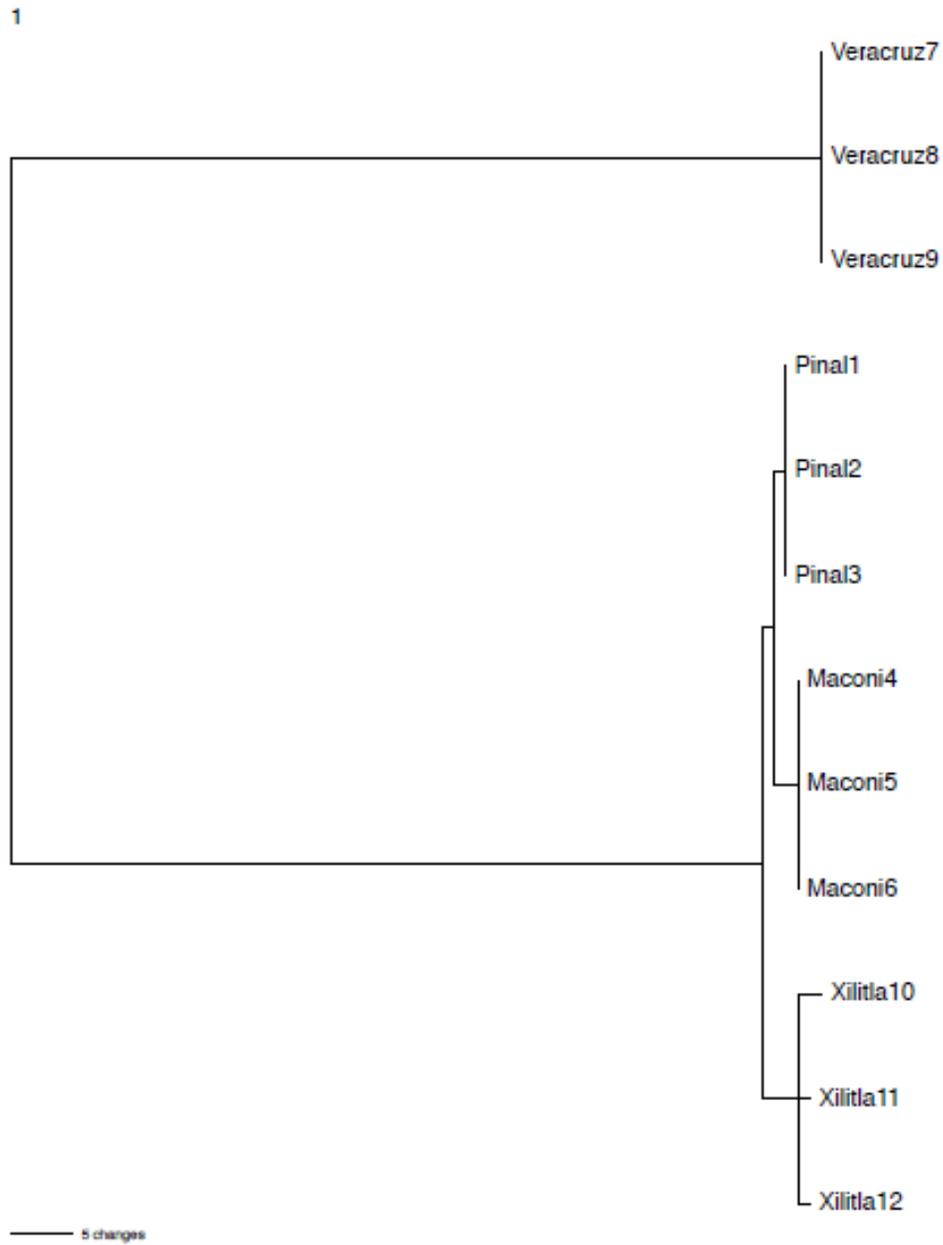


Figura 5. Posición filogenética de *R. orientalis* usando los genes 16S, Cytb y COI. Veracruz7, 8 y 9 corresponden a *R. miotympanum* (grupo externo); Pinal1, 2, 3 corresponden a *R. orientalis* de Pinal de Amoles, Qro; Maconi4, 5 y 6 corresponden a *R. orientalis* de Maconi, Qro; y Xilitla10, 11 y 12 corresponden a *R. orientalis* de Xilitla, S.L.P.

Agradecimientos

A la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales por el permiso de colecta otorgado para llevar a cabo el trabajo SGPA/DGVS/03991/17. Al comité de Bioética de la Universidad Autónoma de Querétaro por la autorización para el presente trabajo. A los biólogos Karla Zaldaña, Belinda de la Cruz, Mario Lugo y Kevin Herroz por su ayuda durante la fase de campo. Finalmente, al laboratorio de Integridad Biótica y al laboratorio de microbiología molecular de la Universidad Autónoma de Querétaro por su apoyo para llevar a cabo la extracción, purificación y amplificación de las muestras. A la técnico M. en C. Evelia Figueroa y la M. en C. Cecilia Gómez por su apoyo en el laboratorio durante la extracción, purificación y amplificación de ADN. A Salvador Ramírez por su apoyo en las pruebas iniciales de la extracción y al Dr. Ulises Esquivel por el apoyo en el préstamo del equipo de laboratorio. Agradecimientos especiales para la gente de la comunidad de solares.

Literatura citada

Batista, A., Hertz, A., Mebert, K. Köhler, G., Lotzkat, S., Ponce, M. y Vesely, M. 2014. Two new fringe-limbed frogs of genus *Ecnomiohyla* (Anura: Hylidae) from Panama. *Zootaxa* 3826(3). 449- 474.

Cervantes-Serna LQ. 2015. Distribución actual y potencial de *Ecnomiohyla miotympanum* (Cope, 1863), usando DIVA-Gis y MaxEnt. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana. 59 p.

Cope ED. 1863. On *Trachycephalus*, *Scaphiopus* and Other American *Batrachia*. *Proceeding of the Academy of Natural Science of Philadelphia* 15: 43-54.

Cortés EA, González LA, Ávalos SV y Sigüenza AG. 2015. Modelos de Especiación. *Evolución Orgánica*. Universidad Nacional Autónoma de México. 25 pp.

Duellman, WE. 1970. The Hylid Frogs of Middle America. *Monograph of the Museum of Natural History*. The University of Kansas. Vol. 1.427 pp.

Duellman WE, Marion AB, Hedges SB. 2016. Phylogenetics, classification and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). *Zootaxa* 4104: 1-109.

Faivovich J, Haddad CFB, García PCA, Frost DR, Campbell JA, Wheeler WC. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hyliinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 294: 1-240.

Faivovich J, Pereyra MO, Luna MC, Hertz A, Blotto BL. 2018. On the monophyly and relationships of several genera of *Hylini* (Anura: Hylidae: Hyliinae), with comments on recent taxonomic changes in hylids. *South American Journal of Herpetology* 13(1): 1-32.

García, E. 1964. Modificaciones al Sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. Núm. 6. Primera edición. 98 pp.

Maddison, D.R. y W.P. Maddison. 2000. *MacClade 4: Analysis of phylogeny and character evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Martínez, J., Pérez, J. y Lara, P. 2014. Estructura y composición de la vegetación del bosque de niebla de Copalillos, San Luis Potosí, México. *Acta Botanica Mexicana*. 106: 161-186.

Mazzamuto, M.V., Galimberti, A., Cremonesi, G., Pisanu, B., Chapuis, J.L., Stuyck, J., Amori, G., Su, H., Aloise, G., Preatoni, D.G., Wauters, L.A., Casiraghi, M. y Martinoli, A. 2016. Preventing species invasion: A role for integrative taxonomy?. *Integrative Zoology*. Vol. 11. 214-228.

Moen, D.S. y Wiens, J.J. 2008. Phylogenetic evidence for competitively driven divergence: body-size evolution in Caribbean treefrogs (Hylidae: *Osteopilus*). *Evolution* 63: 195–214.

Orrico, V.G.D., Nunes, I., Mattedi, C., Fouquet, A., Lemos, A.W., Correa M.R., Lyra, M.L., Loebmann, D., Pimenta, B., Caramaschi, U., Rodrigues, M. y Haddad, C. 2017.

Integrative taxonomy supports the existence of two distinct species within *Hypsiboas crepitans* (Anura: Hylidae). *Salamandra*. 53(1). 99-113.

Padial, J.M., Miralles, A., De la Riva, I. y Vences, M. 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*. 7:16. 14 pp.

Pinto, H- N., Verdade, V. K. y Rodrigues, M. T. 2014. Morphometric variation of *Pipa pipa* (Linnaeus, 1758) (Anura: Pipidae) with notes on diet and gonad development. *Herpetology Notes*. Vol. 7. 7 pp.

Rakotoarison, A., Scherz, M. D., Glaw, F., Köhler, J., Andreone, F., Franzen, M., Glos, J., Hawlitschek, O., Jono, T., Mori, A., Ndriantsoa S., H., Raminosoa, N.R., Riemann, J.C., Rödel M.O., Rosa, G.M., Vieites, D.R., Crottini, A. y Vences, M. 2017. Describing the smaller majority: integrative taxonomy reveals twenty-six new species of tiny microhylid frogs (genus *Stumpffia*) from Madagascar. *Vertebrate Zoology* 67(3): 271:398.

Ron, S.R., Venegas, P.J., Ortega-Andrade, H.M., Gagliardi-Urrutia, G. y Salerno, P. 2016. Systematics of *Ecnomiohyla tuberculosa* with the description of a new species and comments on the taxonomy of *Trachycephalus typhonius* (Anura, Hylidae). *Zookeys* 630: 115-154.

Ronquist, F. y J.P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.

Savage, J. M. 2002. The amphibians and reptiles of Costa Rica: A herpetofauna between two continents, between two seas. The University of Chicago Press. 934 pp.

Vacher, L.P., Kok, P.J.R., Rodrigues, M.T., Lima, J.D., Lorenzini, A., Martinez, Q., Fallet, M., Courtois, E.A., Blanc, M., Gaucher, P., Dewynter, M., Jairam, R., Ouboter, P., Thébaud, C. y Fouquet, A. 2017. Cryptic diversity in Amazonian frogs: Integrative taxonomy of the genus *Anomaloglossus* (Amphibia: Anura: Aromobatidae) reveals a unique case of diversification within the Guiana Shield. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 112: 158-173.

Zamudio, S., Carranza, E., Rzedowski, J. y De Rzedowski, G. 1992. La vegetación del estado de Querétaro. Panorama preliminar. Instituto de Ecología. Centro Regional del Bajío. Primera Edición. 99 pp.

6. Discusión

La especie *Rheohyla miotypanum* fue separada de su antiguo género *Ecnomiohyla* por datos ecológicos y moleculares obtenidos por Batista y colaboradores (2014) y recabados por Duellman y colaboradores (2016) donde mencionan que es la especie monotípica. Así mismo, Faivovich y colaboradores (2018) mencionan la carencia de tres caracteres morfológicos de esta especie respecto a las especies de su antiguo género. Así mismo, el uso de la taxonomía convencional con la integración de más herramientas, bioacústica (en anfibios), folidosis (en reptiles), ecología, biogeografía y DNA mitocondrial y nuclear es uno de los métodos más fuertes para la identificación de especies y resolución de problemas taxonómicos de especies cripticas que no pueden ser resueltos con taxonomía clásica (Batista *et al.*, 2016). La poca información sobre los efectos de barreras geográficas sobre el linaje de las especies y procesos de especiación, hacen que la integración de nuevas herramientas sea cada vez más necesaria, además de mencionar la carencia de estudios usando taxonomía integrativa en México. Sáez (2009), menciona la improbabilidad de una especiación en presencia de barreras geográficas, demostrando la existencia de especies originadas en lugares pequeños y aislados, sin embargo tendríamos que preguntarnos en que momento ese lugar quedo aislado de los otros, posiblemente la existencia de una barrera en el pasado que fue desapareciendo para al final formar un grupo geológico, biológico, ecológico y ambiental que favorecía a una especie y desfavorecía a otras. La selección natural originó procesos de especiación gracias al aislamiento geográfico (posiblemente barreras geográficas en el pasado que fueron desapareciendo y formación de barreras en el presente), a la recombinación de genes y con ello, la formación de nuevos linajes. Por su parte, Cortés *et al.* (2015), mencionan a las barreras geográficas como modelos de especiación, implicando la generación de nuevas especies a través de limitar el flujo génico y basándose en la selección natural.

El anuro *R. miotypanum* es una especie endémica al país, distribuyéndose por el este de México, regularmente en el Bosque de Niebla, entre los 1000 y 2800 m.s.n.m. según Duellman y colaboradores (2016), sin embargo, nuestro estudio consideró diferentes ecosistemas y climas en donde el anuro se ubicó. Por un lado, tenemos Bosque de Niebla

en la parte de Veracruz, Selva Baja Caducifolia rodeada de Bosque de Pino-Encino en Pinal de Amoles, con temperaturas extremas, semidesierto con pequeños parches de bosque secundario y con temperaturas extremas en Maconí y finalmente en Bosque Tropical con una elevación media de 600 m.s.n.m. en Xilitla. Contrario a lo que reportaron Duellman y colaboradores (2016), la especie habita en diversos ecosistemas y que exhiben parámetros ambientales diferentes. También, cabe destacar que este anuro se encuentra a elevaciones menores a 1000 m.s.n.m.

Los datos presentados en este trabajo utilizando herramientas integrativas (morfometría, morfología, bioacústica y biología molecular) dan evidencia de la formación de dos metapoblaciones, la primera formada por la especie tipo *R. miotympanum* (Cope, 1863) de Veracruz y la segunda formada por *R. orientalis* sp. nov de Querétaro, San Luis Potosí y Puebla (de esta última los datos moleculares fueron obtenidos de GenBank) lo cual podría estar relacionado al aislamiento impuesto por las barreras biogeográficas (Sierra Madre Oriental y Eje Neovolcánico Transversal) que existen entre los sitios estudiados. Los datos bioacústicos muestran diferencias entre las dos especies, por un lado como mencionó Duellman (1970), presentan notas monofásicas o difásicas, sin embargo se diferencian por la duración del llamado y por presentar la mayor cantidad de pulsos por nota en el caso de *R. miotympanum*, así como diferencias en la frecuencia dominante, y tasa del llamado, siendo esta últimas dos no significativas como lo mencionó Duellman (1970). La especie *R. orientalis* presenta de una a siete notas tipo A o B formada de un máximo de 102 pulsos, frecuencia dominante de 2856.13 Hz, y una duración del llamado de 0.19 seg. Así mismo, *R. orientalis* presenta un menor número de pulsos por nota A, siendo de uno a 102, mientras que para la nota B es de uno a nueve.

Morfológicamente, *R. orientalis* se diferencia de *R. miotympanum* por carecer de un borde dorsolateral ancho color blanco-amarillento, sin embargo, algunos individuos pueden presentar un borde café con una línea delgada blanca arriba en la parte dorso-lateral. Así mismo, *R. orientalis* presenta un tubérculo metatarsal interno grande y extendido hacia la parte interna, membranas de las patas completas, tocando todos los discos de todos los dígitos y por presentar una apertura anal en forma de “U” no extendida con un borde

blanco no mayor a 1 mm de distancia de la membrana. Finalmente, los análisis moleculares usando tres genes mitocondriales 16S, Cytb y COI indican la formación de dos clados, uno formado por los individuos de Veracruz y el otro formado por los individuos de Querétaro, San Luis Potosí y Puebla. La secuencia que corresponde a Puebla fue obtenida del GenBank por lo que esta etiquetada como *R. miotympanum*, sin embargo, en realidad se trata de *R. orientalis*. Las secuencias difieren en arriba del 4% para 16S, 9% para Cytb y arriba del 12% para COI, indicando la existencia de la nueva especie *R. orientalis*. Es importante apuntar, que bajo los criterios de Orrico y colaboradores (2017), una diferencia genética arriba de 3% para 16S y arriba del 10% para COI es determinante en la identificación de una nueva especie.

7. Conclusión

El presente trabajo mostró la identificación y descripción de una nueva especie del complejo *miotympanum*, ya que desde 1970 se creía que en realidad se trataba de un complejo de especies, sin embargo, no hubo oportunidad de continuar los estudios hasta este trabajo en el año 2017. La formación de límites o barreras que aislen una población juegan un papel muy importante en el flujo génico y la formación de nuevos linajes. *R. orientalis* la podemos encontrar en la Sierra Madre Oriental, mientras que *R. miotympanum* se distribuye en el Eje Neovolcánico Transversal. Sin embargo, se sabe que la distribución del complejo *miotympanum* es desde Tamaulipas hasta Oaxaca y Chiapas, por lo que falta realizar estudios integrativos en las poblaciones de Oaxaca y Chiapas, tomando en cuenta la presencia de la Sierra Madre del Sur, Sierra Norte de Oaxaca y Sierra Sur de Oaxaca.

8. Referencias

Alford, R.A. y Richards, S.J. 1999. Global amphibian declines: A problem in applied ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 30, 133-165.

Badii, C. M. H., Castillo, J. y Guillen, A. 2008. Tamaño óptimo de la muestra. *InnOvaciones de Negocios* 5(1). 13 pp.

- Batista, A., Hertz, A., Mebert, K. Köhler, G., Lotzkat, S., Ponce, M. y Vesely, M. 2014. Two new fringe-limbed frogs of genus *Ecnomiohyla* (Anura: Hylidae) from Panama. *Zootaxa* 3826(3). 449- 474.
- Batista, A. 2016. Taxonomy, Diversity, and biogeography of the herpetofauna of eastern Panama. Tesis para obtener el grado PhD. Universidad de Frankfurt. 308 pp.
- Canseco Márquez, L. y Gutiérrez Mayén M. G., 2010. Anfibios y Reptiles del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. 118 pp.
- Che, J., Chen H. M., Yang, J. Y., Jin, J. Q., Jiang, K., Yuan, Z. Y., Murphy, R. W. y Zhang, Y. P. *Molecular Ecology Resources*. Vol. 12. 247-258.
- Cortés EA, González LA, Ávalos SV y Sigüenza AG. 2015. Modelos de Especiación. *Evolución Orgánica*. Universidad Nacional Autónoma de México. 25 pp.
- Daudin, F. M., 1802. *Histoire Naturelle des Rainettes, des grenouilles, et des crapauds*. Levrault, París, 71 pp.
- Duellman, W. E. 1970. *The Hylid Frogs of Middle America*. Monograph of the Museum of Natural History. The University of Kansas. Vol. 1.427 pp.
- Duellman, W.E. y Trueb, L. 1994. *Biology of Amphibians*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press. 670 pp.
- Duellman, W.E., Marion A.B. y Hedges S.B. 2016. Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). *Zootaxa* 4104 (1): 001-109.
- Espinosa, M.G., Meave, J.A., Marcial, N.R., Aceves, T.T., Hernández, F.G. y Manriquez, G.I. 2012. Los bosques de niebla de México: conservación y restauración de su componente arbóreo. *Ecosistemas* 21 (1-2). 36-52.
- Faivovich, J., Haddad, C.F.B., Garcia, P.C.A., Frost, D.R., Campbell, J.A. y Wheeler, W.C. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to the

Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 294, 1–240.

Faivovich J, Pereyra MO, Luna MC, Hertz A, Blotto BL. 2018. On the monophyly and relationships of several genera of *Hylini* (Anura: Hylidae: Hylinae), with comments on recent taxonomic changes in hylids. *South American Journal of Herpetology* 13(1): 1-32.

Galvis, P. A., Caorsi, V. Z., Pacheco, S. J. y Rada, M. 2016. The advertisement calls of three *Eleutherodactylus* species from Hispaniola (Anura: Eleutherodactylidae). *Bioacoustics*. 13 pp.

Glaw, F., Köhler, J., De la Riva, I., Vieites, D.R. y Vences, M. 2010. Integrative taxonomy of Malagasy treefrogs: combination of molecular genetics, bioacoustic and comparative morphology reveals twelve additional species of *Boophis*. *Zootaxa* 2383. 4 pp.

Goebel, A.M., Donnelly, M.A., Atz, M. 1999. PCR primers and amplification methods for 12S ribosomal DNA, the control region, cytochrome oxidase I, and cytochrome b in bufonids and other frogs, and an overview of PCR primers which have amplified DNA in amphibians successfully. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 11: 163–199.

Hillis, D.M., Mable, B.K., Larson, A., Davids, S.K., Zimmer, E.A., 1996. Nucleic acids IV: sequencing and cloning. In: Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. (Eds.), *Molecular Systematics*. Sinauer, Sunderland, MA, pp. 321–381.

Kaya, U. y Simmons, A. M. 1999. Advertisement calls of the tree frogs, *Hyla arborea* y *Hyla savignyi* (Anura: Hylidae) in Turkey.

Martínez, J. F., Pérez, J. G. y Lara, P. C. 2014. Estructura y composición de la vegetación del bosque de niebla de Copalillos, San Luis Potosí, México. *Acta Botánica Mexicana*. Vol. 106. 161-186.

Mazzamuto, M.V., Galimberti, A., Cremonesi, G., Pisanu, B., Chapuis, J.L., Stuyck, J., Amori, G., Su, H., Aloise, G., Preatoni, D.G., Wauters, L.A., Casiraghi, M. y Martinoli, A.

2016. Preventing species invasión: A role for integrative taxonomy?. *Integrative Zoology*. Vol. 11. 214-228.

Moen, D.S. y Wiens, J.J. 2008. Phylogenetic evidence for competitively driven divergence: body-size evolution in Caribbean treefrogs (Hylidae: *Osteopilus*). *Evolution* 63: 195–214.

Orrico, V.G.D., Nunes, I., Mattedi, C., Fouquet, A., Lemos, A.W., Correa M.R., Lyra, M.L., Loebmann, D., Pimenta, B., Caramaschi, U., Rodrigues, M. y Haddad, C. 2017. Integrative taxonomy supports the existence of two distinct species whithin *Hypsiboas crepitans* (Anura: Hylidae). *Salamandra*. 53(1). 99-113.

Padial, J.M., Castroviejo-Fisher, S., Köhler, J., Vilá, C., Chaparro, J.C. y De la Riva, I. 2009. Deciphering the products of evolution at the species level: the need for an integrative taxonomy. *Zoologica Scripta*. 17 pp.

Padial, J.M., Miralles, A., De la Riva, I. y Vences, M. 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*. 7:16. 14 pp.

Pante, E., Schoelinck, C. y Puillandre, N. 2015. From Integrative Taxonomy to Species Description: One Step Beyond. *Syst. Biol.* 64(1). 152-160.

Parra-Olea, G., Flores-Villela, O. y Mendoza-Almeralla, C. 2014. Biodiversidad de anfibios en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad, Suplo.* 85:460-466.

Pinto, H- N., Verdade, V. K. y Rodrigues, M. T. 2014. Morphometric variation of *Pipa pipa* (Linnaeus, 1758) (Anura: Pipidae) with notes on diet and gonad development. *Herpetology Notes*. Vol. 7. 7 pp.

Puig, H. 1991. Vegetación de la Huasteca México. Estudio fitogeográfico y ecológico. Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM); Instituto de Ecología, A.C.; Centre d'Etudes Mexicaines et Centraméricaines (CEMCA). México, D.F., México. 625 pp.

Rakotoarison, A., Scherz, M. D., Glaw, F., Köhler, J., Andreone, F., Franzen, M., Glos, J., Hawlitschek, O., Jono, T., Mori, A., Ndriantsoa S., H., Raminosoa, N.R., Riemann, J.C.,

- Rödel M.O., Rosa, G.M., Vieites, D.R., Crottini, A. y Vences, M. 2017. Describing the smaller majority: integrative taxonomy reveals twenty-six new species of tiny microhylid frogs (genus *Stumpffia*) from Madagascar. *Vertebrate Zoology* 67(3): 271:398.
- Rise, Ken G., Mazzotti, Frank J., Waddle, J. Hardin y Conill, Marianna D., 2006. Uso de Anfíbios como indicadores del Éxito de la Restauración de Ecosistemas. IFAS Extension, University of Florida. 5 pp.
- Riverón-Zaldívar, A., León-Regagnon, V. y Nieto-Montes de Oca, A. 2003. Phylogeny of the Mexican coastal leopard frogs of the *Rana berlandieri* group based on mtDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30 (2004), 12 pp.
- Roy, D. y Elepfandt, A. 1993. Bioacoustic analysis of frog calls from northeast India. *J. Biosci.*, Vol. 18. No. 3. 13 pp.
- Sáez, A. G. 2009. Genes y especies. *Ecosistemas*. Vol. 18. 8 pp.
- Silva, R. Guerra, V. y Pereira, R. 2016. Acoustic communication in two species of the *Hypsiboas albopunctatus* group (Anura: Hylidae) in sympatry and allopatry. *Zoología* 33(2). 10 pp.
- Tubaro, P. L. 1999. Bioacústica aplicada a la sistemática, conservación y manejo de poblaciones naturales de aves. *Etología*. Vol. 7. 14 pp.
- Vacher, L.P., Kok, P.J.R., Rodrigues, M.T., Lima, J.D., Lorenzini, A., Martinez, Q., Fallet, M., Courtois, E.A., Blanc, M., Gaucher, P., Dewynter, M., Jairam, R., Ouboter, P., Thébaud, C. y Fouquet, A. 2017. Cryptic diversity in Amazonian frogs: Integrative taxonomy of the genus *Anomaloglossus* (Amphibia: Anura: Aromobatidae) reveals a unique case of diversification within the Guiana Shield. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 112: 158-173.
- Velásquez, N. A., Marambio, J., Brunetti, E., Ménde, M.A., Vásquez, R.A. y Penna, M. 2013. Bioacoustic and genetic divergence in a frog with wide geographical distribution. *Biological Journal of the Linnean Society*. Vol. 110. 14 pp.

- Wang, Y., Nansen, C. y Zhang, Y. 2016. Integrative insect taxonomy based on morphology, mitochondrial DNA, and hyperspectral reflectance profiling. *Zoological Journal of the Linnean Society*. Vol. 177. 378-394.
- Welsh, H.H.J., y Ollivier, L.M. 1998. Stream amphibians as indicators of ecosystem stress: A case study from California's redwoods. *Ecological Applications*, 8, 1118-1132.
- Wiens, J.J., Fetzner, J.W., Parkinson, C.L., Reeder, T.W., 2005. Hylid frog phylogeny and sampling strategies for speciose clades. *Systematic Biology* 54: 778–807.
- Wiens, J.J., Kuczynski, A.A., Hua, X. y Moen, D.S. 2010. An expanded phylogeny of treefrogs (Hylidae) based on nuclear and mitochondrial sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Vol. 55. 871-882.
- Xia, Y., Gu, H.F., Peng, R., Chen, Q., Zheng, Y.C., Murphy, R.W. y Zeng, X.M. 2012. COI is better than 16S rRNA for DNA barcoding Asiatic salamanders (Amphibia: Caudata: Hynobiidae). *Molecular Ecology Resources*. Vol. 12. 48-56.
- Zamudio S., Rzedowski, J., Carranza, E. y De Rzedowski, G. 1992. La vegetación en el estado de Querétaro. Instituto de Ecología. Centro Regional del Bajío. 92 pp.