

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y
ARTES DE CHIAPAS**
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

T E S I S

**RELACIÓN FILOGENÉTICA DEL
GÉNERO *Ecnomiohyla* (AMPHIBIA:
HYLIDAE) EN MÉXICO.**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
**CIENCIAS EN BIODIVERSIDAD Y
CONSERVACIÓN DE ECOSISTEMAS
TROPICALES**

PRESENTA
LUIS JAVIER CALOCA PEÑA

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Octubre de 2025



**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y
ARTES DE CHIAPAS**

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

T E S I S

**RELACIÓN FILOGENÉTICA DEL
GÉNERO *Ecnomiohyla* (AMPHIBIA:
HYLIDAE) EN MÉXICO.**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
**CIENCIAS EN BIODIVERSIDAD Y
CONSERVACIÓN DE ECOSISTEMAS
TROPICALES**

PRESENTA

LUIS JAVIER CALOCA PEÑA

DIRECTOR

DR. EDUARDO E. ESPINOZA MEDINILLA
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ASESORES

DR. RENÉ BOLOM HUET
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

DR. ERIK JOAQUÍN TORRES ROMERO
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE PUEBLA

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Octubre de 2025





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

SECRETARÍA ACADÉMICA

Dirección de Investigación y Posgrado

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas a 30 de octubre de 2025

Oficio No. SA/DIP/1317/2025

Asunto: Autorización de Impresión de Tesis

C. Luis Javier Caloca Peña

CVU: 1261117

Candidato al Grado de Maestro en Ciencias en Biodiversidad y
Conservación de Ecosistemas Tropicales

Instituto de Ciencias Biológicas

UNICACH

Presente

Con fundamento en la **opinión favorable** emitida por escrito por la Comisión Revisora que analizó el trabajo terminal presentado por usted, denominado **RELACIÓN FILOGENÉTICA DEL GÉNERO *Ecnomiohyla* (AMPHIBIA: HYLIDAE) EN MÉXICO** y como Director de tesis el Dr. Eduardo Estanislao Espinoza Medinilla (CVU: 201471) quien avala el cumplimiento de los criterios metodológicos y de contenido; esta Dirección a mi cargo **autoriza** la impresión del documento en cita, para la defensa oral del mismo, en el examen que habrá de sustentar para obtener el **Grado de Maestro en Ciencias en Biodiversidad y Conservación de Ecosistemas Tropicales**.

Es imprescindible observar las características normativas que debe guardar el documento, así como entregar en esta Dirección una copia de la *Constancia de Entrega de Documento Recepcional* que expide el Centro Universitario de Información y Documentación (CUID) de esta Casa de estudios, en sustitución al ejemplar empastado.

ATENTAMENTE
"POR LA CULTURA DE MI RAZA"

Dra. Dulce Karol Ramírez López
DIRECTORA



C.c.p. Dra. Alma Gabriela Verdugo Valdez, Directora del Instituto de Ciencias Biológicas, UNICACH. Para su conocimiento.
Dr. José Antonio De Fuentes Vicente, Coordinador del Posgrado, Instituto de Ciencias Biológicas, UNICACH. Para su conocimiento.
Archivo/minutario.
EPL/DKRL/igp/gtr



2025, Año de la mujer indígena
Año de Rosario Castellanos



📍 Ciudad Universitaria, Libramiento Norte
Poniente 1150, Col. Lajas Maciel.
C.P. 29039 Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México
☎ Tel: (961) 6170440 Ext. 4360
✉ investigacionyposgrado@unicach.mx

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías por la beca otorgada la cual me permitió continuar con mis estudios de posgrado.

Al programa de Maestría en Ciencias en Biodiversidad y Conservación de Ecosistemas Tropicales del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas por permitirme continuar con mi formación académica.

A mi director de tesis, el Dr. Eduardo Espinoza Medinilla por su confianza, tiempo y dedicación en mi formación, así como todo el apoyo brindado hasta la fecha.

A mis asesores el Dr. René Bolom Huet y el Dr. Erik Joaquín Torres Romero por sus importantes observaciones, comentarios y sugerencias que ayudaron a mejorar el manuscrito.

Al Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular (LIDiaM) y a su personal académico, por brindarme el espacio y equipo necesario para el desarrollo de este trabajo, así como de las múltiples asesorías recibidas, muchas gracias.

A las colecciones científicas de El Colegio de la Frontera Sur, Unidad San Cristóbal de las Casas, del Museo de Zoología “Alfonso L. Herrera”, de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México y del Museo de Historia Natural de la Universidad de San Carlos, Guatemala, por su recibimiento y facilitarme los ejemplares para su revisión física, además de proporcionarme material biológico para el desarrollo de este trabajo. También agradecer a Daniel Sánchez-Ochoa por proporcionarme material biológico de *Ecnomiohyla* de Nahá.

Finalmente, a mi esposa Viviana e hijos, Luis y Santi, quienes con su apoyo han sido mi fortaleza y motivación para seguir adelante en este interesante mundo de los anfibios. Gracias también por su apoyo en campo, especialmente a Luis.

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN.....	1
II.- MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Definición de filogenia y su relevancia en biología evolutiva.....	3
2.2 Datos moleculares y elección del grupo externo en inferencias filogenéticas	6
2.3 Métodos de reconstrucción filogenética	8
2.4 Filogenia y sistemática de Hylidae	10
2.4.1 Características generales del grupo	11
2.4.2 Problemas conceptuales en la clasificación de las ranas arborícolas	12
2.4.3 Importancia de las filogenias en la resolución taxonómica de Hylidae	14
2.5 El género <i>Ecnomiohyla</i> FAIVOVICH, HADDAD, GARCÍA, FROST, CAMPBELL Y WHEELER, (2005).	16
2.5.1 El género <i>Ecnomiohyla</i> en México.....	19
2.5.2 Relevancia ecológica y de conservación	20
2.5.3 Dificultades para establecer relaciones filogenéticas dentro del género <i>Ecnomiohyla</i>	22
2.6 Biogeografía del sur de México y Centroamérica.....	24
2.6.1 México y Centroamérica Nuclear y su importancia herpetofaunística	24
2.6.2 El Istmo de Tehuantepec como barrera biótica	27
2.6.3 Chiapas como zona de transición y su relevancia para la herpetofauna.....	30
III.- ANTECEDENTES	31
3.1 Distribución del género <i>Ecnomiohyla</i> en México	32
3.2 Avances taxonómicos y nuevos registros	32
3.3 Filogenia y estudios moleculares	33
IV.- HIPÓTESIS.....	35
V.- OBJETIVOS.....	35
5.1 Objetivo general	35

5.2 Objetivos particulares	35
VI.- MATERIALES Y MÉTODOS	36
6.1 Obtención de muestras.	36
6.1.1 Especies de <i>Ecnomiohyla</i> con distribución en México.	36
6.1.2 Otras especies de <i>Ecnomiohyla</i>	38
6.1.3 Selección del grupo externo.	38
6.2 Obtención de las secuencias.....	38
6.2.1 Extracción de Ácido desoxirribonucleico (DNA)	39
6.2.2 Elección de los genes.	39
6.2.3 Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	40
6.2.4 Purificación y secuenciación	40
6.3 Edición y comparación de las secuencias	41
6.4 Reconstrucciones filogenéticas	41
6.5 Redescrición y diagnosis	44
VII.- RESULTADOS	45
7.1 Reconstrucciones filogenéticas	46
7.1.1 Topología del análisis Bayesiano de probabilidades posteriores	47
7.1.2 Topología del análisis de Máxima Verosimilitud	48
7.2 Diagnosis y análisis de los especímenes	50
VIII.- DISCUSIÓN.....	63
8.1 Relaciones filogenéticas y patrones biogeográficos.....	65
8.1.1 Posición filogenética y delimitación específica de <i>Ecnomiohyla miliaria</i>	67
8.1.2 Posibles escenarios biogeográficos: vicarianza y refugios climáticos	70
8.2 Historia evolutiva de las poblaciones chiapanecas	75
8.2.1 Persistencia en una red de refugios	76
8.2.2 Expansión postglacial desde un único refugio.....	77
8.2.3 Distribución continua hasta épocas recientes.....	79

8.3 Diagnóstico morfológico y congruencia filogenética de <i>Ecnomiohyla sp. nov.</i>	81
8.4 Limitaciones y futuras direcciones.....	82
IX.- CONCLUSIONES	84
X.- RECOMENDACIONES	85
XI.- LITERATURA CITADA.....	86
XII.- ANEXOS	100

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Especímenes utilizados para la obtención de secuencias mencionados en el texto. Aquellos con acceso a GenBank fueron generados por el estudio de Batista <i>et al.</i> , (2014).....	43
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol filogenético de los reinos Plantae, Protista y Animalia, propuesto por Haeckel (1866) en Leopardi-Verde y Escobedo-Sarti, (2001).	4
Figura 2. Distribución de la familia Hylidae en el mundo. Fuente: AmphibiaWeb, 2025.	11
Figura 3. Características distintivas de una rana del género <i>Ecnomiohyla</i> . A) Muestra una extensa membrana interdigital entre los dedos de la mano. B) Muestra una extensa membrana interdigital entre los dedos de la pata. C) Indica la coloración dorsal similar a los musgos y un flequillo de piel festoneado a lo largo del margen externo de la pata (flecha blanca).....	17
Figura 4. Distribución geográfica de las especies de <i>Ecnomiohyla</i> . A) Modificado de Mendelson <i>et al.</i> , (2015). B) Modificado de Batista <i>et al.</i> , (2014).	18
Figura 5. Ubicación de Centroamérica Nuclear y sur de México, en número se muestran las principales barreras geológicas, así como la distribución del género <i>Ecnomiohyla</i> en la región, también se muestran algunos puntos de endemismos en el sur de México (Sierra Juárez y Los Tuxtlas). SMB, Bloque del sur de México. Las barreras se numeran de la siguiente manera: 1, Istmo de Tehuantepec, 2, Sistema de fallas Motagua-Polochic-Jocotán (Valle del Motagua), 3, Depresión de Nicaragua. Modificado de Mendoza <i>et al.</i> , (2019).....	25
Figura 6. Hábitat de la localidad tipo de <i>E. echinata</i> . A) Remanentes de bosque mesófilo de montaña a 1 600 msnm. B) Vista panorámica de la Sierra Juárez de Oaxaca desde la localidad tipo.	45

Figura 7. Filogenia del género *Ecnomiohyla* reconstruida por medio de análisis Bayesiano bajo el modelo GTR+G+I y basado en las secuencias del gen mitocondrial 16S. El soporte estadístico se indica con los valores de probabilidades posteriores ubicados encima de las ramas. Se indican los clados A y B referidos en el texto.....48

Figura 8. Filogenia del género *Ecnomiohyla* reconstruida por medio del análisis de Máxima verosimilitud bajo el modelo GTR+G+I y basado en las secuencias del gen mitocondrial 16S. El soporte estadístico se indica con los valores del bootstrap no paramétrico (1 000 pseudo-replicas) ubicados encima de las ramas.....49

Figura 9. Muestra algunos de los caracteres de una *E. valancifer*. A) Hembra adulta mostrando piel sobre el dorso predominantemente lisa. B) Mano izquierda mostrando el desarrollo de las membranas interdigitales. C) Pata izquierda mostrando el desarrollo de las membranas interdigitales. D) Franja de piel a lo largo de la pata con un aspecto festoneado.51

Figura 10. Muestra los diferentes tipos de coloración observados en una *E. valancifer*. A) Espécimen ECO-SCH-4855 con color café rojizo, adoptado después de la metacrosis. B) Color verde olivo uniforme. C) Espécimen ECO-SCH-4856 con color verde moteado (coloración habitual).....52

Figura 11. Caracteres de una *Ecnomiohyla sp. nov.* A) Hembra adulta (ECO-SCH-4859) mostrando piel sobre el dorso rugosa, nótese la mancha en forma de pata con tres dedos en la superficie de la cabeza, así como los puntos de color naranja (flechas blancas). B) Mano izquierda mostrando el prepólex. C) Pata izquierda mostrando el desarrollo de las membranas interdigitales. D) Franja de piel a lo largo de la pata con un aspecto festoneado, también se visualizan los puntos de color naranja (ECO-SCH-4854).....53

Figura 12. Muestra los diferentes tipos de coloración observados en una *Ecnomiohyla sp. nov.* A) Color café rojizo, adoptado después de la metacrosis con puntos naranjas visibles (flechas blancas). B) Espécimen ECO-SCH-4854 con color verde claro. C) Color verde con manchas marrón oscuro (coloración habitual). En todas las variaciones de color

siempre está presente la mancha en forma de pata con tres dedos y los puntos de color naranja.54

Figura 13. Muestra algunos de los caracteres de una *Ecnomiohyla sp. nov.* (población Nahá), en la figura se muestra al individuo MZFC-36211. A) Macho adulto mostrando su aspecto general y coloración en vida. B) Mano izquierda mostrando el desarrollo de las membranas interdigitales, así como el prepólex. C) Pata izquierda mostrando el desarrollo de las membranas interdigitales. D) Detalle de la parte dorsal de la cabeza, muestra la mancha en forma de pata con tres dedos (elipse) y los puntos naranjas (flechas blancas). Todas las fotografías fueron tomadas de Barrio-Amorós *et al.*, (2024).56

Figura 14. Ejemplar MZFC-36211 A) Muestra el color café rojizo con manchas verde oscuro adoptado después de la metacrosis, puntos naranjas son visibles. B) Muestra co- osificación craneal y piel granulada. C) Muestra la proyección humeral en ambos brazos (flecha roja). Fotografías: (A) Tomada de Barrio-Amorós *et al.*, (2024).56

Figura 15. *E. minera*, macho adulto (USAC-3475). A) Aspecto general mostrando detalles sobre la forma y posición de los tubérculos sobre la piel, nótese la proyección humeral indicada por la flecha blanca. B) Mano izquierda mostrando el desarrollo de las membranas interdigitales, así como el prepólex. C) Muestra los múltiples tubérculos sobre la superficie dorsal del cuerpo. D) Vista de la superficie ventral del cuerpo, muestra las proyecciones humerales indicadas por las flechas blancas. Fotografías: (A) Carlos V. Almazán.58

Figura 16. A) Vista dorsal de la posición y distribución de las excrecencias nupciales (flechas rojas) en el macho de *E. minera* (USAC-3475). B) Se observa con detalle las características morfológicas de las excrecencias nupciales observadas en el espécimen USAC-3475.58

Figura 17. Individuo de *E. minera* (USAC-4433) proveniente de Puerto Barrios, Izabal, Guatemala, probablemente hembra debido a la ausencia de excrecencias nupciales en la base del pulgar. A) Aspecto general mostrando la coloración en vida. B) Vista dorsal

de la mano derecha mostrando el desarrollo de las membranas interdigitales. C) Vista dorsal mostrando la coloración sobre la superficie del cuerpo. Todas las fotografías fueron por Andrés Novales.....59

Figura 18. Hembra adulta de *E. salvaje* (USAC-4434). A) Aspecto general mostrando la coloración en vida adoptado después de la metacrosis, también nótese el pliegue de piel festoneado (flecha blanca). B) Mano derecha mostrando el desarrollo de las membranas interdigitales, así como el prepólex. C) Pata derecha mostrando el desarrollo de las membranas interdigitales, así como parte del pliegue de piel festoneado. D) Vista de la superficie dorsal del cuerpo mostrando la distribución de los múltiples tubérculos bajos y redondeados. Fotografías: (A) Carlos V. Almazán.62

Figura 19. Ejemplar de *E. salvaje* en la fase de “Metamorfo” y etapa 45 de desarrollo de acuerdo a Gosner, (1960) (USAC-4435). A) Aspecto general mostrando la coloración en vida. B) Vista dorsal del ejemplar en preservación. C) Vista ventral del ejemplar en preservación). Fotografías: (A) Carlos V. Almazán.....62

Figura 20. Distribución geográfica actual de las especies de *Ecnomiohyla* presentes en el núcleo centroamericano. Mapa modificado de Mendelson *et al.*, (2015).64

Figura 21. Comparación de los refugios pleistocénicos propuestos en Mesoamérica con la distribución actual de las especies de *Ecnomiohyla*. A) Hubbard (1973): 1. Californiano, 2. Sonorense, 3. Chihuahuense, 4. Del Golfo, 5. del Balsas, 6. De Tehuantepec, 7. De Yucatán. Toledo (1982): 8. Córdoba, 9. Los Tuxtlas, 10. Sierra de Juárez, 11. Soconusco, 12. Lacandona, 13. Petén, 14. Montañas Mayas, 15. Izabal. Wendt (1987): 16. El Arco. Brown (1982): 17. Guatemala (desde Oaxaca hasta honduras), 18. Pacífico (desde el Soconusco hasta El Salvador), 19. Chiriqui-Azuero, 20. Tacarcuna/Nechí; Tomado de Ríos (2014). B) Distribución geográfica actual de las especies de *Ecnomiohyla* presentes en el núcleo centroamericano. Mapa modificado de Mendelson *et al.*, (2015).74

RESUMEN

La delimitación taxonómica y la comprensión de la diversidad del género de ranas arborícolas *Ecnomiohyla* en el sur-sureste de México han sido limitadas históricamente por la escasez de ejemplares y la falta de análisis filogenéticos. Este estudio se determinó las relaciones filogenéticas de los linajes mexicanos del grupo utilizando un marcador molecular y métodos de Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud, combinado con análisis morfológicos detallados de las especies incluidas. Los resultados confirmaron la existencia de un nuevo linaje, *Ecnomiohyla sp. nov.* cuya delimitación está respaldada por la evidencia molecular, morfológica y de distribución geográfica, la cual está limitada al estado de Chiapas. Filogenéticamente, *E. sp. nov.* es recuperada como especie hermana de *E. valancifer*, indicando que los linajes mexicanos conforman un grupo monofilético respecto a los clados centroamericanos. Morfológicamente, este nuevo linaje se distingue por la presencia de una piel dorsal rugosa-granulada, una mancha cefálica en forma de pata con tres dedos y la ausencia de excrescencias nupciales queratinizadas. La estrecha relación de *E. sp. nov.* con *E. valancifer* y la distribución aparentemente disyunta de las poblaciones en el estado de Chiapas sugieren patrones biogeográfico complejos, interpretados bajo las hipótesis de vicarianza por cambios tectónicos, persistencia en refugios climáticos y dispersión postglacial. Para robustecer y corroborar esta historia evolutiva, es necesario integrar un enfoque multiloci, análisis de reloj molecular, tiempos de divergencia y modelado ecológico.

Palabras clave: Chiapas, *Ecnomiohyla sp. nov.*, Vicarianza, refugios.

ABSTRACT

Taxonomic delimitation and the understanding of diversity within the treefrogs genus *Ecnomiohyla* in southeastern Mexico have been historically limited by scarce sampling and lack of phylogenetic analyses. This study determined the phylogenetic relationships of the Mexican lineages of the group using one molecular marker and methods of Bayesian and Maximum Likelihood Inference, combined with detailed morphological analyses of the included species. The results confirmed the existence of a new lineage, *Ecnomiohyla sp. nov.* whose delimitation is supported by the congruence of molecular, morphological, and geographic distribution evidence. Which is restricted to the state of Chiapas. Phylogenetically, *E. sp. nov.* is recovered as the sister species to *E. valancifer*, indicating that the Mexican lineages form a monophyletic group from the Central American clades. Morphologically, this new lineage is distinguished by the presence of rugose-granular dorsal skin, a three-toed paw-shaped cephalic mark, and the absence of keratinized nuptial excrescences. The close relationship of the *E. sp. nov.* with *E. valancifer* and the apparently disjunct distribution of populations in the state of Chiapas suggest complex biogeographic patterns, interpreted under the hypotheses of vicariance due to tectonic changes, persistence in climatic refugia, and postglacial dispersal. To strengthen and corroborate this evolutionary history, it is necessary to integrate a multilocus approach, molecular clock analyses, divergence dating, and ecological modeling.

Keywords: Chiapas, *Ecnomiohyla sp. nov.*, Vicariance, Refugia.

I.- INTRODUCCIÓN

En los últimos años, los estudios sobre la biodiversidad y taxonomía de los anfibios han aumentado considerablemente, principalmente como resultado de la creciente preocupación por los efectos negativos producidos por la modificación y destrucción del hábitat sobre sus poblaciones (Crawford *et al.*, 2013), lo que ha impulsado la descripción de un mayor número de especies. La comprensión de la diversidad biológica no se limita a contabilizar el número de especies, sino a desentrañar las relaciones evolutivas que las conectan. En este sentido, los análisis filogenéticos se han convertido en una herramienta fundamental para interpretar los procesos históricos que originan y moldean la diversidad (Gregory, 2008).

Las filogenias permiten entender la historia evolutiva de diferentes linajes; esta puede analizarse a grandes rasgos mediante un enfoque macroevolutivo, el cual estudia los cambios de linajes completos (conjuntos de especies) a lo largo de periodos geológicos que abarcan desde miles hasta millones de años (Herron y Freeman, 2014). El enfoque macroevolutivo utiliza caracteres morfológicos y/o moleculares, estos últimos, aunque pueden ser de diversa índole, usualmente son secuencias de ADN de regiones específicas con grados de variación proporcionales a la profundidad con la que se quiera hacer el estudio (Wiley y Lieberman, 2011).

Estudios que involucren relaciones filogenéticas entre los individuos, así como su distribución, se han empleado para definir linajes filogenéticos, identificar barreras geográficas y evaluar patrones regionales de diversidad y estructura poblacional (Miller *et al.*, 2006). Además, pueden contribuir a la determinación de unidades taxonómicas relevantes para la conservación (Moritz, 1994), como es el caso de especies crípticas y especies consideradas como “raras”, que, debido a sus características, su determinación se vuelve más compleja (Crawford *et al.*, 2013).

Entre los anfibios, los hílidos representan una de las familias más diversas y ampliamente distribuidas en el Neotrópico (Duellman *et al.*, 2016). Muchos de sus linajes presentan patrones complejos de diversificación, frecuentemente mediados por factores geográficos, históricos y ecológicos (Faivovich *et al.*, 2018).

Un ejemplo de lo anterior lo constituyen las ranas del género *Ecnomiohyla* Faivovich, Haddad, García, Frost, Campbell, y Wheeler, (2005), un grupo de anuros arborícolas compuesto por 12 especies distribuidas desde el sur de México hasta Colombia. Estas ranas presentan adaptaciones singulares a la vida en el dosel, como la reproducción en huecos de árboles llenos de agua o en axilas de bromelias, membranas interdigitales extensas y un patrón de coloración críptico semejante al musgo (Savage, 2002, Batista *et al.*, 2014). A pesar de estas características distintivas, se trata de un grupo escasamente conocido debido a sus hábitos de vida en el dosel, lo que ha dificultado su observación y estudio. Además, la sistemática del grupo presenta incertidumbres considerables.

Uno de los principales retos para comprender la sistemática de *Ecnomiohyla* ha sido la escasez de datos moleculares. La mayoría de los estudios que han involucrado a los miembros de este género, se han centrado en la delimitación morfológica de las especies (Savage y Kubicki, 2010; Batista *et al.*, 2014), mientras que solo unos pocos han incorporado evidencia genética y ninguno ha considerado un muestreo representativo de todas las especies reconocidas (Duellman *et al.*, 2016; Faivovich *et al.*, 2018). Esta situación limita la formulación de hipótesis filogenéticas robustas y dificulta la comprensión de los patrones de diversificación y delimitación específica. Por ello, resulta prioritario reconocer los patrones genéticos y filogeográficos del grupo, ya que estos aportan información clave para su conservación.

En México, el género está representado por tres especies: *Ecnomiohyla minera* en la Selva Lacandona (Chiapas) (Barrio-Amorós *et al.*, 2024), *E. echinata* en la Sierra Juárez (Oaxaca) (Duellman, 1961) y *E. valancifer* en la región de Los Tuxtlas (Veracruz) (Fierschein y Smith, 1956). A pesar de encontrarse en zonas biogeográficamente relevantes para el estudio de la herpetofauna (Ochoa-Ochoa y Flores-Villela, 2006), estas especies han sido escasamente reportadas y no han sido incluidas en estudios filogenéticos del grupo. Durante muestreos realizados en el año 2017 en la Zona Sujeta a Conservación Ecológica (ZSCE) La Pera, en el marco del proyecto “Ecología reproductiva de *Ecnomiohyla valancifer*” desarrollado por El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) unidad San Cristóbal, se detectó una población de *Ecnomiohyla* cuya

identidad específica no pudo determinarse con certeza, lo que planteó interrogantes sobre sus afinidades evolutivas dentro del género.

Considerando la ubicación de esta nueva población en la vertiente norte de Chiapas, en una zona de transición biogeográfica entre Centroamérica y Norteamérica, surge la necesidad de evaluar su posición filogenética respecto a las demás especies mexicanas y centroamericanas del género. Este análisis permitirá esclarecer no solo su identidad evolutiva, sino también los patrones históricos que han modelado la distribución de *Ecnomiohyla* en la región, y contribuir al desarrollo de estrategias para su conservación. Por ello, resulta indispensable contextualizar este estudio mediante una revisión de los fundamentos filogenéticos y biogeográficos aplicados al análisis de anuros.

II-. MARCO TEÓRICO

2.1 Definición de filogenia y su relevancia en biología evolutiva

En biología evolutiva, las filogenias se han consolidado como una de las herramientas más robustas para explicar las relaciones de parentesco entre organismos. Estas relaciones se representan gráficamente mediante árboles filogenéticos o cladogramas, que ilustran las conexiones entre linajes derivados de un ancestro común (Leopardi-Verde y Escobedo-Sarti, 2001). En esencia, una filogenia es una hipótesis que busca reconstruir el patrón de divergencia entre linajes, permitiendo inferir cómo y cuándo surgieron distintas especies a partir de ancestros comunes (Sosa, 2009). Más allá de mostrar relaciones genealógicas, las filogenias constituyen la base para interpretar procesos como la diversificación, la evolución de rasgos adaptativos y la distribución geográfica de los organismos (Leopardi-Verde y Escobedo-Sarti, 2001).

Históricamente, la comprensión de la diversidad biológica estuvo influida por concepciones jerárquicas y estáticas, como la *scalae naturae* de Aristóteles, que organizaba a los seres vivos en una supuesta cadena ascendente desde formas “inferiores” a “superiores” (Sosa, 2009). Incluso Linneo, al desarrollar su sistema de nomenclatura binomial en el siglo XVIII, aún concebía un orden natural fijo, siguiendo un plan preestablecido. Fue hasta finales del siglo XIX cuando Ernst Haeckel introdujo el

término *filogenia* y propuso los primeros árboles evolutivos como representaciones gráficas de las relaciones históricas entre organismos (Figura 1) (Leopardi-Verde y Escobedo-Sarti, 2001).

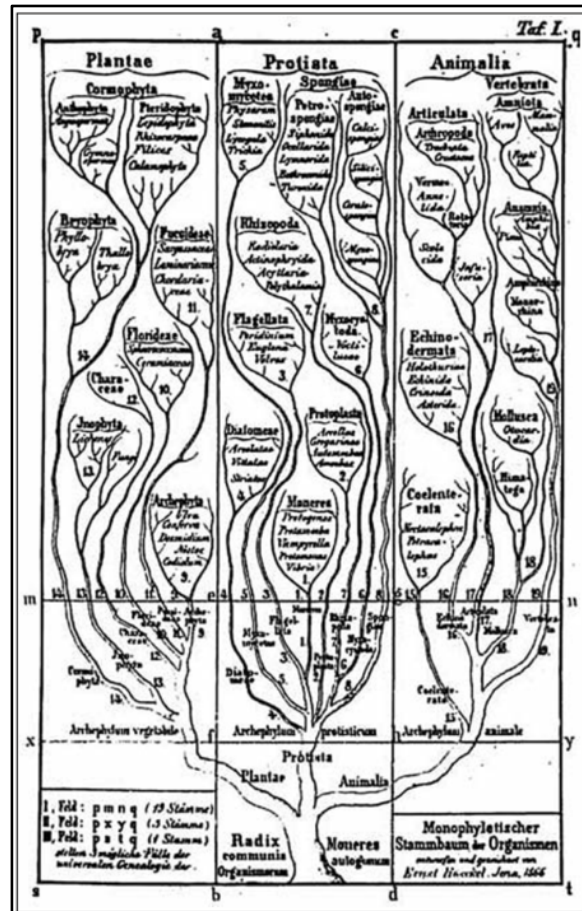


Figura 1. Árbol filogenético de los reinos Plantae, Protista y Animalia, propuesto por Haeckel (1866) en Leopardi-Verde y Escobedo-Sarti, (2001).

El enfoque moderno fue consolidado por Willi Hennig, quien estableció los principios de la sistemática filogenética. En su obra *Grundzüge einer Theorie der phylogenetischen Systematik* (1950), propuso interpretar las relaciones evolutivas en términos genealógicos, identificando linajes hermanos mediante caracteres derivados compartidos, denominados *sinapomorfias*, esta perspectiva implicó que solo los grupos *monofiléticos*, es decir, aquellos que incluyen un ancestro común y todos sus descendientes, deberían ser reconocidos y nombrados (Nixon y Ochoterena, 2001; Morrone, 2000). Así, la filogenia se convirtió no solo en una herramienta para clasificar, sino también para inferir procesos evolutivos subyacentes.

Una filogenia ideal se representa como un árbol dicotómico, cuya estructura básica incluye: la *raíz*, que simboliza el ancestro común; los *nodos*, que representan eventos de especiación; las *ramas* son las líneas que conectan dos nodos, representando el tiempo evolutivo; y las *terminales*, son las partes finales donde se ubican las entidades estudiadas, como especies (Sosa, 2009). Es fundamental distinguir las filogenias de otras representaciones como dendrogramas o fenogramas, que agrupan entidades según similitudes generales, sin inferir relaciones evolutivas. Mientras que una filogenia se construye sobre la teoría de la descendencia común, los dendrogramas describen similitud observable con base en otros criterios, como la morfología, lo que puede conducir a interpretaciones erróneas cuando la similitud se debe, por ejemplo, a evolución convergente (adaptación a entornos similares) (Leopardi-Verde y Escobedo-Sarti, 2021).

La filogenia permite explicar y predecir patrones biológicos complejos. Facilita inferencias sobre el orden de aparición de ciertos caracteres, estimar tasas de evolución, origen y dispersión geográfica de los linajes, e incluso identificar linajes relictos o adaptativos (Leopardi-Verde *et al.*, 2017). También permite mapear características ecológicas o morfológicas, lo cual es clave para entender procesos como la radiación adaptativa o la convergencia evolutiva (Harvey y Pagel, 1991; Wiens, 2005).

A partir de ello, es posible explorar preguntas fundamentales en biología evolutiva, como ¿por qué algunos clados exhiben gran diversidad mientras que otros permanecen escasamente diversificados?, o ¿qué procesos históricos han promovido tales diferencias? Estas comparaciones permiten identificar posibles tendencias evolutivas y evaluar los procesos que las han generado. Además, al superponer información geográfica o ecológica sobre los árboles filogenéticos, se pueden generar hipótesis sobre los centros de origen, rutas de dispersión y evolución de caracteres, contribuyendo a reconstruir la historia natural de los linajes (Sosa, 2009).

Al analizar la evolución de los caracteres sobre árboles filogenéticos, se pueden formular hipótesis sobre trayectorias evolutivas, secuencia de adquisición de rasgos y origen de adaptaciones. En algunos casos, es posible introducir indicadores del tiempo que ha llevado la divergencia del linaje en cuestión, trazando el largo de las ramas en forma proporcional al tiempo transcurrido. Para ello, es posible incorporar información

temporal, como el registro fósil o estimaciones de tasas de evolución molecular, lo que permite inferir la cronología de divergencia entre linajes (Sosa, 2009).

Finalmente, las filogenias han transformado la sistemática moderna. A diferencia del sistema Linneano, que agrupaba por similitud general, el enfoque filogenético propone clasificaciones que reflejan la historia evolutiva del grupo de estudio. Hoy en día, las clasificaciones taxonómicas basadas en filogenias buscan reconocer únicamente grupos monofiléticos, en este sentido, las filogenias no solo determinan el parentesco, sino que también guían qué grupos deben ser reconocidos y nombrados, proporcionando un marco coherente y evolutivamente informado para disciplinas como la ecología y la biogeografía (Sosa, 2009).

2.2 Datos moleculares y elección del grupo externo en inferencias filogenéticas

La reconstrucción filogenética implica una serie de decisiones metodológicas fundamentales, entre las que destacan la selección de los caracteres a comparar y la elección del grupo externo. Aunque tradicionalmente se han empleado caracteres morfológicos o conductuales, en las últimas décadas los datos moleculares se han consolidado como la fuente principal de información para los análisis filogenéticos. Esta preferencia se debe a su alta resolución, reproductibilidad y capacidad de abordar relaciones evolutivas tanto profundas como recientes (Jiang *et al.*, 2014; Leopardi-Verde *et al.*, 2017).

Los caracteres moleculares se derivan directamente del estudio del genoma, ya sea mediante marcadores específicos o secuencias completas de ácido desoxirribonucleico (ADN). Entre las fuentes de ADN más comunes se encuentran regiones del ADN mitocondrial (p. ej. 12S, 16S, CytB, COI), del ADN nuclear (p. ej. RAG1 o POMC) o, en el caso de las plantas, del cloroplasto. (Jiang *et al.*, 2014). La elección de estas regiones depende, en gran medida, de la escala evolutiva del estudio. Por ejemplo, para relaciones entre especies cercanas, se prefieren secuencias con una tasa de mutación relativamente alta, como los genes mitocondriales en animales, ya que permiten detectar variabilidad suficiente para discriminar entre linajes (Avise, 2004; Wiens y Penkrot, 2002).

El ADN mitocondrial (mtDNA), ha sido una herramienta central en estudios de delimitación de especies debido a su estructura compacta, herencia materna y alta tasa de evolución. Si bien la sistemática molecular contemporánea favorece cada vez más la integración de marcadores de ADN nuclear (nDNA) para obtener perspectivas filogenéticas más robustas, el mtDNA sigue siendo un marcador fundamental para el estudio inicial de linajes (Portik *et al.*, 2023). Estas características facilitan la identificación de linajes evolutivos independientes, por lo que continúa siendo una herramienta particularmente eficiente para estudios sistemáticos de grupos crípticos, endémicos o escasamente muestreados (Sites y Marshall, 2003; Prado *et al.*, 2011).

Una vez definido el conjunto de especies a analizar (grupo interno), el siguiente paso crucial es la selección del grupo externo (outgroup). Este último es un linaje situado por fuera del grupo de interés, que se asume haber divergido más tempranamente con respecto a todos los taxa en estudio (grupo interno) y su función primordial es establecer un punto de comparación para enraizar el árbol y determinar la dirección del cambio evolutivo (Maddison *et al.*, 1984). Conceptualmente, la inclusión del grupo externo permite polarizar los caracteres, es decir, discernir cuáles estados son ancestrales y cuáles son derivados. Sin esta polarización, las semejanzas entre taxones podrían interpretarse de forma equívoca, y la reconstrucción del árbol perdería su valor explicativo (Bryan, 2001; Wiley y Lieberman, 2011).

La relación entre datos moleculares y grupo externo es, por tanto, complementaria. Mientras que las secuencias ofrecen la materia prima para la comparación, el grupo externo aporta la perspectiva evolutiva desde la cual interpretar dicha comparación. La combinación de ambos permite identificar sinapomorfías (caracteres derivados compartidos) los cuales están presentes en el grupo interno y ausentes en el grupo externo y sustentan la hipótesis de monofilia del grupo interno, así como reconocer simplesiomorfías (rasgos ancestrales compartidos) presentes tanto en el grupo externo como en algunos miembros del grupo interno. Sin la correcta polarización de los caracteres, la reconstrucción de la historia evolutiva de los rasgos a lo largo de la filogenia sería imposible (Leopardi-Verde y Escobedo-Sarti, 2021).

En el contexto de datos moleculares, la elección adecuada del grupo externo es aún más crítica, ya que, en ausencia de grupo externo, los métodos para polarizar caracteres genéticos son considerablemente menos confiables (Leopardi-Verde y Escobedo-Sarti, 2021). El grupo externo ideal debe ser lo suficientemente cercano al grupo de estudio como para permitir una alineación precisa de secuencias, pero lo bastante divergente como para no ser confundido como parte del grupo interno.

La correcta selección de caracteres y del grupo externo es particularmente relevante en estudios que buscan resolver la identidad evolutiva de taxones poco conocidos o con taxonomía compleja, como lo suele ser el caso de muchos anfibios neotropicales. Además de contribuir al conocimiento de la historia evolutiva, los análisis filogenéticos basados en datos moleculares ofrecen herramientas críticas para la conservación, al delimitar unidades evolutivamente significativas y detectar linajes relictos o en riesgo (Bryan, 2001).

En síntesis, el uso de datos moleculares y la elección del grupo externo representan pilares fundamentales en las inferencias filogenéticas modernas. Su aplicación cuidadosa permite no solo reconstruir relaciones de parentesco con mayor precisión, sino también interpretar patrones evolutivos, ecológicos y biogeográficos de manera más informada.

2.3 Métodos de reconstrucción filogenética

Una vez que los datos moleculares han sido seleccionados y el grupo externo apropiado ha sido definido, el siguiente paso en la reconstrucción filogenética es la aplicación de métodos computacionales para inferir las relaciones de parentesco entre los organismos. Estos métodos transforman los datos, principalmente secuencias de ADN, en hipótesis filogenéticas mediante el uso de algoritmos y modelos evolutivos explícitos. Métodos como la máxima parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana permiten generar estas hipótesis con distintos niveles de robustez y complejidad (Leopardi-Verde y Escobedo Sarti, 2021). Es importante mencionar que, en muchos de estos métodos, la aplicación de modelos evolutivos es crucial para interpretar los datos de manera precisa.

En el análisis de máxima parsimonia, la filogenia se infiere a partir del árbol que involucre el menor número de cambios evolutivos, disminuyendo así la presencia de caracteres homoplásticos (Swofford *et al.*, 1996). El método de máxima verosimilitud evalúa la probabilidad de observar los datos que consiste en el alineamiento obtenido, dado el modelo evolutivo propuesto, posteriormente las filogenias se infieren encontrando los árboles con el mayor valor de verosimilitud (log-likelihood) (Martínez-Castilla, 2007).

En el análisis bayesiano no se busca una sola topología óptima sino una población de árboles muestreados en función de su probabilidad posterior (PP). Esta inferencia se basa en la relación entre la función de verosimilitud y las distribuciones anteriores y posteriores de la probabilidad según el teorema de Bayes. A diferencia del método de máxima verosimilitud en el que se calcula la probabilidad de los datos dado el modelo, el enfoque bayesiano estima la probabilidad posterior de la hipótesis (árbol + modelo) dados los datos (modelo de sustitución y alineamiento), por lo que puede interpretarse como la probabilidad de que dicho árbol sea correcto (Martínez-Castilla, 2007).

El soporte estadístico de las relaciones filogenéticas se realiza generalmente mediante un análisis de bootstrap no paramétrico (BS), el cual estima la varianza asociada a una distribución muestral desconocida. Este método realiza re-muestreos con reposición al azar de los datos originales, formando nuevos conjuntos de datos, en donde quedan representados diferentes puntos del conjunto original (ramas del árbol) una o varias veces. Este análisis se realiza en reconstrucciones de máxima parsimonia y máxima verosimilitud (Swofford *et al.*, 1996). En los análisis bayesianos, la confiabilidad de la filogenia se obtiene mediante el muestreo de toda la probabilidad posterior de las filogenias posibles y posteriormente se disciernen los elementos comunes a los árboles con probabilidades posteriores mayores (Martínez-Castilla, 2007).

Tanto en el análisis de máxima verosimilitud como en el bayesiano se necesita de un modelo evolutivo explícito. Estos modelos, que estiman cómo y con qué probabilidad ocurren los cambios mutacionales en el ADN, varían en complejidad desde el modelo más simple, como el de Jukes Cantor (JC) que asume frecuencias de bases y tasas de sustitución iguales, hasta otros más complejos como el de Kimura (K2P), los de Hasegawa, Kishino y Yano (HKY85), y el GTR (General Time Reversible), que permiten

diferencias en transiciones/transversiones y composiciones nucleotídicas, ofreciendo un mejor ajuste a la diversidad de datos biológicos (Swofford *et al.*, 1996; Martínez-Castilla, 2007; Leopardi-Verde y Escobedo-Sarti, 2021).

2.4 Filogenia y sistemática de Hylidae

Las relaciones evolutivas y filogenéticas entre las familias de los anfibios vivientes son fundamentales para interpretar su biogeografía y construir una clasificación significativa (Duellman y Trueb, 1986). En las últimas décadas, el conocimiento sobre la filogenia de los anuros ha crecido exponencialmente (Duellman *et al.*, 2016; Faivovich *et al.*, 2005, 2018). Sin embargo, a pesar del constante crecimiento en el número de especies descritas, la resolución de sus relaciones filogenéticas no avanza a una velocidad comparable, creando desafíos en la comprensión de su diversidad (Haas, 2003; Crawford *et al.*, 2013).

Los anuros constituyen el orden más numeroso de los anfibios modernos, con más de 50 familias y 7823 especies descritas (Frost, 2025). Dentro de este vasto grupo, la familia Hylidae, comúnmente conocida como ranas arborícolas, representa uno de los linajes más diversos y ampliamente distribuidos (Figura 2). Su singular ecología y morfología, junto con una historia evolutiva compleja, las convierte en un grupo de particular interés para la aplicación de estudios filogenéticos (Crawford *et al.*, 2013), estos estudios son esenciales para dilucidar sus verdaderas relaciones evolutivas y establecer una clasificación natural y robusta.

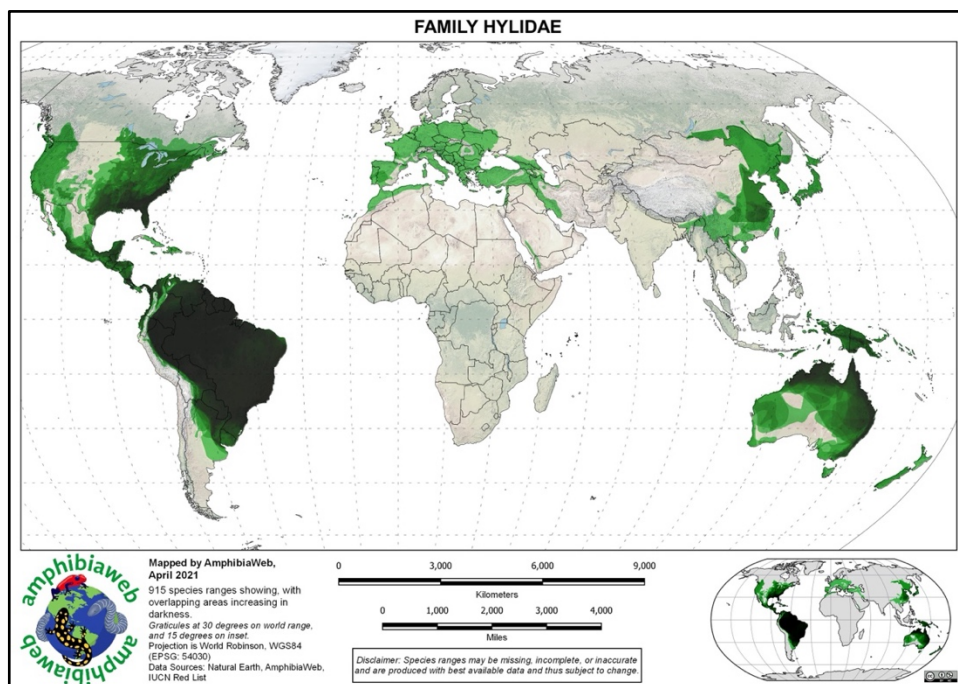


Figura 2. Distribución de la familia Hylidae en el mundo. Fuente: AmphibiaWeb, 2025.

2.4.1 Características generales del grupo

Las ranas hílidas (Familia Hylidae) constituyen la segunda familia más grande de anfibios existentes, solo superadas por la familia Leptodactylidae (Frost, 2025). Estos anuros, son conocidos coloquialmente como ranas arborícolas, la familia se caracteriza por mostrar adaptaciones especializadas para este tipo de vida, por ejemplo, una ventosa adhesiva en la parte ventral de la punta de los dedos y la presencia de un cartílago intercalar pequeño insertado sobre cada dedo entre la última y la penúltima falange (Duellman y Trueb, 1986). Gracias a estas estructuras pueden desplazarse, cambiar de posición y dirección sin separar manos y pies del sustrato, adicionalmente, estas ranas son relativamente delgadas, con una excepcional habilidad para saltar (Duellman y Trueb, 1987; Duellman *et al.*, 2016).

La distribución de los hílidos es muy amplia y diversa, abarcando el continente americano, la región Australo-Papú, Europa, el extremo norte de África, el oeste y este de Asia, y el archipiélago japonés (Faivovich *et al.*, 2018). Tradicionalmente, la familia se había dividido en cuatro subfamilias, sin embargo, análisis filogenéticos han redefinido la

familia Hylidae, restringiéndola a las subfamilias Hylinae, Pelodyadinae y Phyllomedusinae, tras la exclusión de Hemiphractinae (Faivovich *et al.*, 2005; Duellman *et al.*, 2016; Faivovich *et al.*, 2018). Dentro de esta reestructuración, la subfamilia Hylinae y Phyllomedusinae son las más diversas y representativas en Sudamérica y Mesoamérica, con una notable presencia de Hylinae también en Norteamérica y el género *Hyla* en Eurasia. Por su parte, la subfamilia Pelodyadinae, rica en especies, se restringe a la región Australo-Papú (Duellman *et al.*, 2016).

2.4.2 Problemas conceptuales en la clasificación de las ranas arborícolas

En los últimos años, la clasificación de las ranas arborícolas ha cambiado drásticamente. Existen diversos estudios, desde los que se han basado solamente en evidencia morfológica (p. ej. Duellman, 2001), hasta los que han incluido información molecular (Faivovich *et al.*, 2005; Wiens *et al.*, 2010; Duellman *et al.*, 2016; Faivovich *et al.*, 2018). Desde su reconocimiento por Daudin (1800), en donde incluyó 27 especies en un género, el número de especies de las ranas hílidas ha crecido constantemente, actualmente 1077 especies se encuentran repartidas en 52 géneros (AmphibiaWeb, 2025) (Figura 2).

A pesar de este crecimiento y los avances en las herramientas de estudio, la taxonomía de las ranas arborícolas, particularmente a nivel de familia y de subfamilia, ha enfrentado históricamente numerosos problemas conceptuales que han derivado en una clasificación inestable. Estudios clave, como los de Faivovich, *et al.*, (2005), Duellman, *et al.*, (2016) y Faivovich, *et al.*, (2018), han sido fundamentales para identificar y reorganizar estas complejas clasificaciones, sentando las bases para un sistema taxonómico más estable y coherente con las relaciones evolutivas.

En este contexto, uno de los desafíos fundamentales ha sido la demostración reiterada de la parafilia de los “Hylidae” mediante análisis de datos moleculares. Uno de los primeros estudios en evidenciar y abordar sistemáticamente estas inconsistencias fue el de Faivovich, *et al.*, (2005). Este trabajo reveló que las relaciones sistemáticas de la mayoría de las ranas hílidas habían sido problemáticas por mucho tiempo, cuestionando la monofilia de Hylidae y señalando la inconsistencia en la ubicación de clados clave como Pelodyadinae y Phyllomedusinae. Adicionalmente, Faivovich *et al.*, (2005)

identificaron que la subfamilia Hylinae presentaba relaciones internas “mal entendidas”, con numerosos géneros definidos de forma artificial, careciendo de una base filogenética sólida.

Posteriormente, Duellman *et al.*, (2016) reforzaron y expandieron la comprensión de estos problemas conceptuales al demostrar reiteradamente la parafilia de los “Hylidae” mediante análisis de datos moleculares. Este estudio destacó que, si bien algunas subfamilias dentro de Hylidae (como Hylinae, Pelodryadinae y Phyllomedusinae) eran monofiléticas individualmente, su ubicación exacta en el árbol filogenético, y la relación de parentesco con sus grupos hermanos más cercanos dentro del linaje de las ranas arborícolas, permanecían sin determinarse de forma concluyente. En conjunto, estos grupos eran parafiléticos con respecto a linajes como Centrolenidae y Leptodactylidae, lo que contribuía significativamente a la inestabilidad de la clasificación.

Más recientemente, Faivovich, *et al.*, (2018) confirmaron que los cambios taxonómicos resultantes de análisis filogenéticos previos, refiriéndose a los de Duellman *et al.*, (2016), continuaban generando controversia, lo que subraya la persistencia de desafíos conceptuales. Este estudio profundizó en la problemática, evidenciando que varios géneros dentro de Hylini, como el género *Ecnomiohyla*, no eran monofiléticos o su monofilia era cuestionable en su definición actual, y que las relaciones entre muchos géneros aún permanecían sin una resolución clara.

Estos problemas intrínsecos a la definición y delimitación de los taxones, sumados a las limitaciones en la obtención de datos, hacen que la resolución de gran parte de la filogenia de las ranas arborícolas continúe siendo incompleta o altamente controversial. Además, dentro de este grupo se ha sugerido la existencia de linajes crípticos morfológicamente similares, cuya determinación resulta compleja debido a que no presentan caracteres fenotípicos que ayuden a diferenciarlas, aunque los datos moleculares sugieren que podrían tratarse de un complejo de diferentes especies, como el caso de *Triprion spinosus* (Faivovich *et al.*, 2018).

Otro factor relevante son las especies aparentemente raras, cuya existencia se ha conocido por décadas basándose únicamente en los especímenes tipo o el material de la localidad tipo (Pimienta *et al.*, 2005; Wickramasinghe *et al.*, 2013). Cecilias cavadoras, salamandras del género *Oedipina* y ranas que habitan en el dosel de bosques y selvas tropicales son ejemplos de estas especies, cuya observación es poco frecuente, lo que las lleva a ser percibidas como muy raras (Kamei *et al.*, 2009; Wickramasinghe *et al.*, 2013). Las ranas del género *Ecnomiohyla* son un caso particularmente relevante de esta situación, con varias especies escasamente conocidas o registradas solo a partir del material limitado (Batista, *et al.*, 2014). Esta situación resulta en muy poca información disponible de estas especies y, por ende, en un estado incompleto de la exploración sistemática de los taxones y de sus caracteres tanto morfológicos como moleculares.

2.4.3 Importancia de las filogenias en la resolución taxonómica de Hylidae

Ante los problemas conceptuales históricos y la inestabilidad en la clasificación de las ranas arborícolas, como la recurrente parafilia de la familia Hylidae y la indefinición de numerosos géneros, la filogenia molecular ha emergido como una herramienta indispensable y fundamental para la resolución taxonómica y la construcción de una clasificación natural basada en la monofilia. Los avances en la secuenciación de ADN y los métodos de análisis filogenético han permitido construir hipótesis de relaciones evolutivas más robustas, que son esenciales para una taxonomía más precisa y que reflejen la verdadera historia evolutiva.

En este contexto, el estudio de Faivovich *et al.*, (2005) fue crucial para la sistemática de los Hylidae. Mediante un análisis filogenético exhaustivo que combinó datos moleculares y morfológicos, logró por primera vez una visión comprensiva de las relaciones internas de la familia. Faivovich *et al.*, (2005) propusieron una revisión taxonómica mayor, estableciendo grupos monofiléticos y redefiniendo varios géneros, sentando las bases para una clasificación más estable y coherente con los principios evolutivos.

Posteriormente, Duellman *et al.*, (2016) llevaron a cabo un análisis filogenético a gran escala, ampliando la cobertura taxonómica para abarcar un mayor número de especies. Su investigación fue crucial para resolver la parafilia de los Hílidos al proponer una nueva clasificación que reconocía a cuatro familias monofiléticas dentro del clado Arboranae: Hylidae, Centrolenidae, Phyllomedusinae y Hemiphractidae. Esta reorganización taxonómica, sustentada en evidencia molecular, proporcionó una solución a las relaciones de grupo hermano previamente sin resolver y a la parafilia a nivel de familia, contribuyendo significativamente a la estabilidad y monofilia en la clasificación de las ranas arborícolas.

En trabajos más recientes, como el de Faivovich *et al.*, (2018), la aplicación de análisis filogenéticos detallados con una mayor cobertura de taxones y genes, ha permitido continuar el proceso de consolidación y precisión de la clasificación. A pesar de que este estudio reconoce que persisten controversias y que la monofilia de algunos géneros de Hylini aún se cuestiona o sus relaciones no están completamente resueltas, este estudio ha contribuido a abordar específicamente la delimitación de géneros complejos y a proporcionar nuevas hipótesis de relaciones, avanzando hacia la eventual resolución de las últimas dudas taxonómicas.

La implementación de estas filogenias en la clasificación no solo proporciona un marco más preciso para entender la diversidad de las ranas arborícolas, sino que también tiene implicaciones profundas para campos como la biogeografía, la conservación y el estudio de la evolución de caracteres. Al tener una clasificación estable y basada en la monofilia, se facilita la investigación comparativa y se mejora la toma de decisiones para la conservación de estas especies, muchas de las cuales enfrentan amenazas significativas en sus hábitats.

2.5 El género *Ecnomiohyla* FAIVOVICH, HADDAD, GARCÍA, FROST, CAMPBELL Y WHEELER, (2005).

El género *Ecnomiohyla* Faivovich, Haddad, García, Frost, Campbell, y Wheeler, (2005), agrupa a ranas arborícolas de tamaño mediano a grande y está compuesto por 12 especies (Frost, 2025), 11 de las cuales han sido descritas desde 1943, incluyendo cuatro en los últimos 15 años (Mendelson *et al.*, 2008; Savage y Kubicki, 2010; Batista *et al.*, 2014).

Se distinguen por una combinación particular de características morfológicas y ecología asociada a ambientes selváticos húmedos, dónde el dosel constituye el hábitat característico de todas sus especies conocidas. Los miembros del género son reconocibles por tener manos y patas muy grandes, así como una extensa membrana entre los dedos, aparentemente pensada para facilitar el desplazamiento y controlar la caída en el dosel de bosques (Figura 3A, B) (Mendelson *et al.*, 2008). La mayoría presentan una coloración dorsal similar a los musgos lo que les permite ocultarse eficazmente cuando están en contacto con ramas y troncos llenos de ellos, presentan discos digitales agrandados, un flequillo de piel festoneado a lo largo del margen externo del antebrazo y pata (Figura 3C), así como un prepólex de gran tamaño en machos adultos (Savage, 2002; Batista *et al.*, 2014; Savage y Kubicki, 2010). Su distribución se extiende desde el sur de México a través de Centroamérica hasta Colombia (Figura 4A, B).

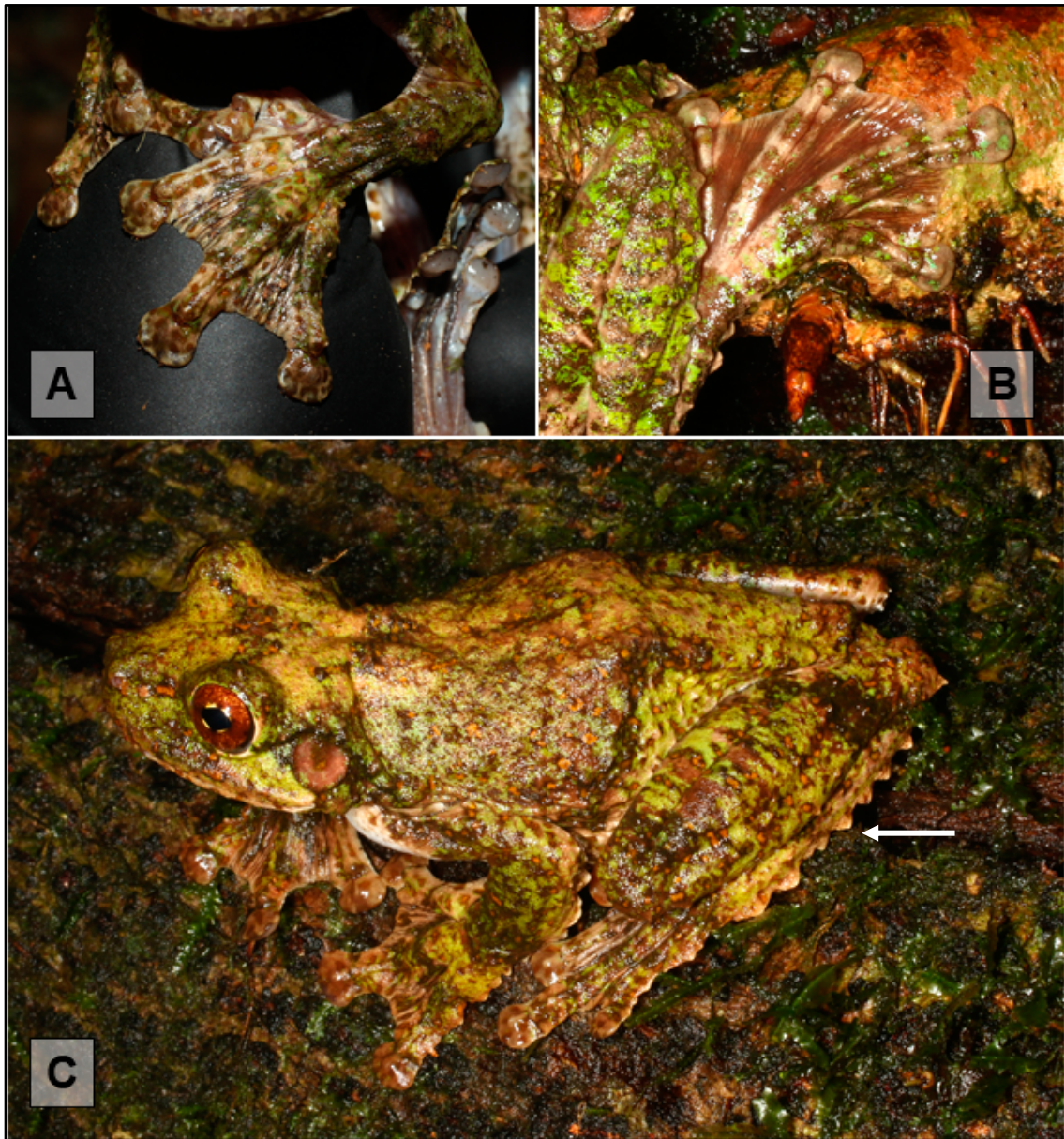


Figura 3. Características distintivas de una rana del género *Ecnomiohyla*. A) Muestra una extensa membrana interdigital entre los dedos de la mano. B) Muestra una extensa membrana interdigital entre los dedos de la pata. C) Indica la coloración dorsal similar a los musgos y un flequillo de piel festoneado a lo largo del margen externo de la pata (flecha blanca).

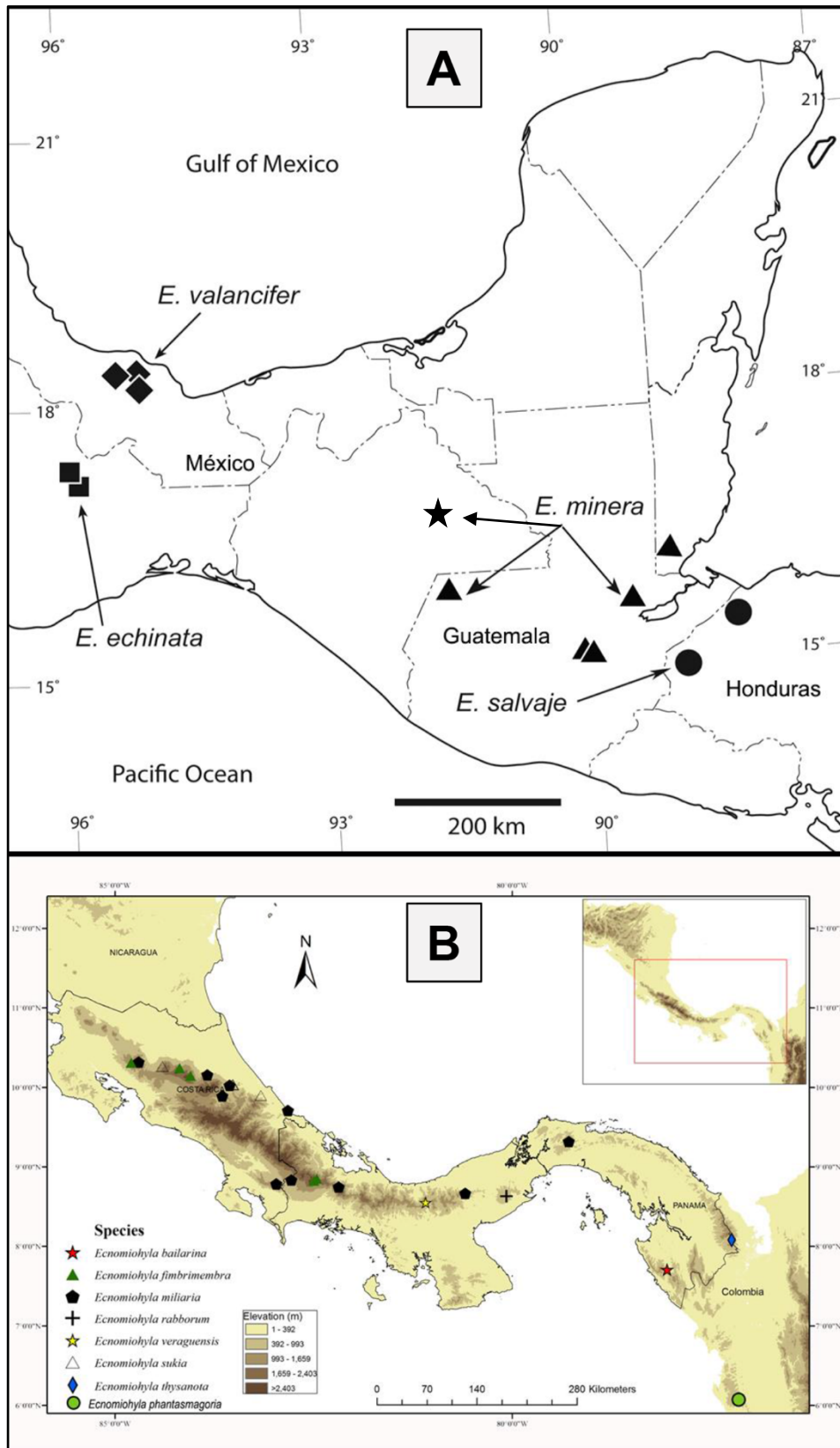


Figura 4. Distribución geográfica de las especies de *Ecnomiohyla*. A) Modificado de Mendelson *et al.*, (2015). B) Modificado de Batista *et al.*, (2014).

2.5.1 El género *Ecnomiohyla* en México

Actualmente, tres especies son reportadas para México, *Ecnomiohyla echinata* (Duellman, 1961) en la Sierra Juárez, Oaxaca; *E. valancifer* (Fierschein and Smith, 1956) en la región de Los Tuxtlas al sur del estado de Veracruz; *E. minera* (Wilson *et al.*, 1985; Barrio-Amorós *et al.*, 2024) en la Selva Lacandona, Chiapas (Figura 4A). Las descripciones mencionadas a continuación, corresponden a las de Mendelson *et al.*, (2015).

Ecnomiohyla valancifer (Fierschein and Smith, 1956)

Se trata de una especie de hílido grande, los machos alcanzan un tamaño de 75.5 mm (**n=1**) de longitud hocico cloaca (LHC), las hembras miden 81.9 mm de LCH (**n=1**); presentan la siguiente fórmula membranal en las manos: $I2 - 2\frac{1}{2}II1^+ - 2III1\frac{3}{4} - 1^+IV$, mientras que en las patas es la siguiente: $I1\frac{1}{2} - 2II\frac{3}{4} - 1\frac{3}{4}III1^+ - 1\frac{1}{2}IV1\frac{3}{4} - \frac{3}{4}V$; piel sobre el dorso del cuerpo lisa con un número variable de tubérculos bajos e indistintos sobre la superficie lateral; piel sobre la superficie dorsal de la cabeza no co-osificada con elementos craneales subyacentes; proyección humeral en machos presente; prepólex fuertemente proyectado con el extremo aplanado, excrecencias nupciales aparentemente ausentes; franja de piel sobre la pata y tarso débilmente festoneado extendiéndose hasta el 5to dedo; franja de piel sobre el antebrazo y mano formada por tubérculos bajos e indistintos.

Ecnomiohyla echinata (Duellman, 1961).

Mendelson y colaboradores (2015) revisaron los únicos especímenes colectados, dos hembras y un macho, aportando la siguiente descripción: una especie de hílido grande, machos (**n=1**) 58.3 mm LCH, hembras (**n=2**) 58.8 - 69.5 mm LCH; fórmula membranal en las manos: $I2 - 2\frac{1}{2}II1 - 2III2 - 1\frac{1}{2}IV$, mientras que en las patas es la siguiente: $I1 - 2II1 - 2III\frac{3}{4} - 2IV1\frac{1}{2} - \frac{3}{4}V$; piel lisa sin tubérculos sobre la superficie dorsal y lateral del cuerpo; piel sobre la superficie dorsal de la cabeza no co-osificada con elementos craneales subyacentes; proyección humeral en macho ausente; prepólex débilmente proyectado, en forma sub-oval, machos con excrecencias nupciales agrupadas, estas

tienen forma de espinas cónicas queratinizadas y son de color negro; franja de piel sobre la pata y tarso en forma de pliegue tarsal irregular; franja de piel sobre el antebrazo y mano en forma de pliegue tarsal, extendiéndose hasta el 5to dedo.

Ecnomiohyla minera (Wilson, McCranie y Williams, 1985).

Los machos miden entre 54.1 y 75.5 mm de LHC (**n=5**), mientras que las hembras van desde los 53.9 hasta los 71.3 mm de LHC; fórmula membranal en las manos: $I2 - 2\frac{1}{2}III1 - 2III1\frac{3}{4} - 1IV$, mientras que en las patas es la siguiente: $I\frac{3}{4} - 1\frac{1}{2}II\frac{3}{4} - 1\frac{1}{2}III1 - 1\frac{1}{4}IV1\frac{1}{2} - \frac{3}{4}V$; piel sobre la superficie dorsal del cuerpo con tubérculos bajos e indistintos, volviéndose más distintivos lateralmente; piel sobre la superficie dorsal de la cabeza co-ossificada con elementos craneales subyacentes; proyección humeral en macho presente; prepólex fuertemente proyectado, débilmente bífido, rodeado de excrecencias nupciales granulares de color negro; franja de piel sobre la pata y tarso formado con proyecciones altas de forma triangular algunas unidas entre sí que se extienden hasta el 5to dedo; franja de piel sobre el antebrazo y mano con una serie baja de tubérculos distintivos sobre la superficie del antebrazo que se extienden hasta el 4to dedo.

2.5.2 Relevancia ecológica y de conservación

Las especies del género *Ecnomiohyla* se distribuyen principalmente en selvas tropicales húmedas de tierras bajas, selvas tropicales premontanas y bosques mesófilos, entre los 20-2000 metros de elevación (Batista *et al.*, 2014). Debido a sus hábitos arborícolas y a su nicho reproductivo altamente especializado (huecos, cavidades y bromelias con agua), las especies de *Ecnomiohyla* poseen requerimientos ecológicos muy específicos. Necesitan selvas tropicales con un alto grado de conservación, que contengan árboles altos, abundantes musgos y plantas epífitas.

Estas ranas tienen hábitos reproductivos del tipo fitotelma, es decir, se reproducen en huecos de árboles llenos de agua o en axilas de bromelias. Es en estos microhábitats donde los machos vocalizan para atraer a las hembras, se lleva a cabo el amplexo y donde depositan los huevos, completando el desarrollo de los renacuajos (Savage,

2002). Esta estrategia reproductiva, sumada a su morfología, les permite pasar gran parte de su vida en el dosel de los árboles, siendo rara vez encontrados en los estratos bajos de bosques y selvas tropicales. Se ha sugerido que su gran tamaño, la rugosidad y el grosor de su piel, junto con la presencia de osteodermos, les proporcionan protección contra la desecación en las copas de los árboles (Duellman, 2001).

Una característica distintiva de *Ecnomiohyla* es su capacidad de planear. Probablemente todos los miembros del género realizan saltos a modo de “paracaídas” (Savage, 2002), utilizando sus grandes manos, patas y las franjas de piel de sus extremidades para aumentar su superficie corporal. Al saltar desde una percha, estas ranas extienden los antebrazos y las piernas, abren los dedos de par en par y los arquean hacia arriba, facilitando el planeo. Sin embargo, esta especialización las hace intrínsecamente vulnerables. Considerando que la pérdida del hábitat es una de las principales amenazas para la diversidad de anfibios (Ramírez-Bautista *et al.*, 2021), este grupo de anuros se encuentra en una posición de riesgo considerable.

La vulnerabilidad del género se refleja en su estado de conservación. Todos los miembros del género se encuentran dentro de alguna categoría de riesgo según la Lista Roja de Especies Amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN), siendo las categorías “En Peligro Crítico” (CR) y “Vulnerable” (VU) las más comunes (AmphibiaWeb. 2025). Esto se atribuye principalmente a la distribución tan restringida que poseen las diferentes especies; algunas, como *E. echinata*, son conocidas únicamente de su localidad tipo e incluso no han sido observadas en varias décadas (Mendelson *et al.*, 2015). Dada su estricta dependencia de ecosistemas forestales bien conservados y su vida en el dosel, la continua degradación y disminución de la extensión del hábitat agrava significativamente su situación de riesgo.

2.5.3 Dificultades para establecer relaciones filogenéticas dentro del género *Ecnomiohyla*

Las investigaciones sobre *Ecnomiohyla* enfrentan desafíos significativos, muchos de ellos derivados de los hábitos de vida de sus especies. Debido a su comportamiento arborícola y difícil observación, los holotipos de varias especies a menudo han sido los únicos especímenes conocidos por un largo periodo de tiempo (Batista *et al.*, 2014). En México, esta situación es particularmente evidente, ya que muy pocos ejemplares han sido reportados desde su descripción; *E. chinata* solo se conoce de la localidad tipo y su último reporte data de 1969 (Mendelson *et al.*, 2015), *E. valancifer* ha sido reportada en muy pocas ocasiones; y *E. minera*, descubierta recientemente, se conoce únicamente de un solo ejemplar (Barrio-Amorós *et al.*, 2024). Como consecuencia, en México, el conocimiento sobre las especies del género es escaso o nulo, limitando la mayoría de los estudios a evaluaciones para la IUCN y la NOM-059. Es muy probable que una situación similar ocurra con las demás especies del género en otras regiones.

La escasez de especímenes en colecciones científicas implica que aspectos cruciales como su taxonomía, historia natural, biogeografía y sistemática son muy poco conocidos (Thorp *et al.*, 2021). Aunque estas ranas son aparentemente raras, su baja abundancia percibida se basa probablemente en que la mayoría de los investigadores de anfibios utilizan métodos tradicionales de búsqueda ajustados a cuerpos de agua (Batista *et al.*, 2014). Por lo tanto, esta percepción de rareza podría ser una consecuencia directa de técnicas de muestreo limitadas o inapropiadas, así como la falta de estudios sistemáticos enfocados en el dosel de los árboles.

Estas limitaciones en la obtención de datos han repercutido directamente en la resolución de las relaciones filogenéticas del género. Las complicaciones para establecer relaciones filogenéticas dentro del género *Ecnomiohyla* han sido una constante en la investigación taxonómica. Faivovich *et al.*, (2005) manifestaron dudas sobre la monofilia del género, estas inquietudes se vieron respaldadas por análisis filogenéticos posteriores, como los de Smith *et al.*, (2007), Wiens *et al.*, (2010) y Pyron y Wiens (2011), que consistentemente no lograron recuperar la monofilia del *Ecnomiohyla*.

La sistemática del género ha experimentado cambios significativos, con especies previamente asociadas a *Ecnomiohyla* siendo reubicadas; por ejemplo, *Ecnomiohyla tuberculosa* fue transferida al género *Tepuihyla* por Ron *et al.*, (2016). Savage y Kubicki (2010) propusieron agrupaciones basadas en características morfológicas, como la proyección humeral y las excrescencias nupciales, distinguiendo tres grupos: el grupo *minera* (incluyendo especies como *E. minera*, *E. rabborum* y *E. salvaje*), el grupo *miliaria* (que abarca a *E. miliaria*, *E. phantasmagoria*, *E. sukia*, *E. valancifer*) y el grupo *fimbrimembra* (que incluye a *E. echinata* y *E. fimbrimembra*). Sin embargo, estas fueron consideradas “agrupaciones por similitud” carentes de una discusión de una clara evidencia de monofilia, en ocasiones en conflicto con la distribución de otras características taxonómicas.

Por otro lado, los análisis filogenéticos han revelado complejidades adicionales. Aunque Batista *et al.*, (2014) realizaron uno de los primeros análisis filogenéticos del género y reconocieron ciertos grupos, investigaciones más recientes, como la de Faivovich *et al.*, (2018), si bien corroboraron la monofilia de algunos grupos (p. ej. el grupo *miliaria*), también han indicado la no monofilia de otros (p. ej. el grupo *fimbrimembra*).

Esta persistente falta de resolución y las contradicciones en los análisis filogenéticos subrayan la necesidad de una investigación más exhaustiva y la inclusión de un mayor número de especies en futuros estudios. En particular, la comprensión de la evolución de los caracteres en este grupo se beneficiaría enormemente de la incorporación de especies como *E. phantasmagoria*, *E. salvaje*, *E. thysanota* y *E. valancifer* en análisis filogenéticos exhaustivos. En este contexto, la inferencia filogenética se vuelve una herramienta indispensable para la correcta delimitación de especies, permitiendo la identificación de unidades evolutivas distintas. Estos análisis son cruciales no solo para resolver ambigüedades taxonómicas, sino también para una comprensión precisa de la diversidad real dentro del género. Hasta que se realicen estos análisis o se identifiquen sinapomorfías claras, especies como *E. echinata*, *E. salvaje* y *E. valancifer* permanecen sin una asignación clara a los grupos de especies previamente propuestos (Faivovich *et al.*, 2018).

2.6 Biogeografía del sur de México y Centroamérica

La distribución de las especies en el sur de México y Centroamérica se comprende intrínsecamente a través del análisis de su compleja historia geológica y climática (Campbell, 1999). Esta vasta y dinámica región de Mesoamérica, que constituye una zona de transición fundamental entre las regiones Neártica y Neotropical, se caracteriza por ser un mosaico de diversas provincias biogeográficas y por la presencia de barreras y corredores naturales significativos (Figura 5) (Halffter, 2017). Estos factores han moldeado patrones únicos de distribución, endemismo y diversificación para una amplia gama de taxa, incluyendo de manera prominente a la herpetofauna, la exploración de estos fenómenos biogeográficos es esencial para contextualizar la diversidad biológica observada en la región (Duellman, 2001).

2.6.1 México y Centroamérica Nuclear y su importancia herpetofaunística

Centroamérica Nuclear (CAN) es una región biogeográfica geológicamente compleja y dinámica, que se extiende desde el Istmo de Tehuantepec en el sureste de México hasta la Depresión de Nicaragua (Figura 5), esta región, topográfica y biológicamente diversa, posee una historia geológica intrincada debido a su ubicación en la interfaz de tres placas tectónicas principales (Rovito *et al.*, 2012). Las tierras altas de la CAN incluyen tanto cadenas montañosas antiguas no volcánicas (como la Sierra de los Cuchumatanes) como volcanes más recientes de edad Terciaria y Cuaternaria a lo largo de la vertiente del Pacífico de la Meseta de Guatemala (Rovito *et al.*, 2012). Dentro de una delimitación más amplia de Centroamérica, esta región también abarca áreas clave como las tierras altas nucleares occidentales y las tierras altas nucleares orientales, incluyendo el Bloque Chortis (Mata-Silva *et al.*, 2019). La CAN se caracteriza por su paisaje montañoso fragmentado y una alta diversidad de hábitats, incluyendo extensos bosques nublados, lo que la convierte en un punto clave para la biodiversidad neotropical (Rovito *et al.*, 2012; Rovito *et al.*, 2015).

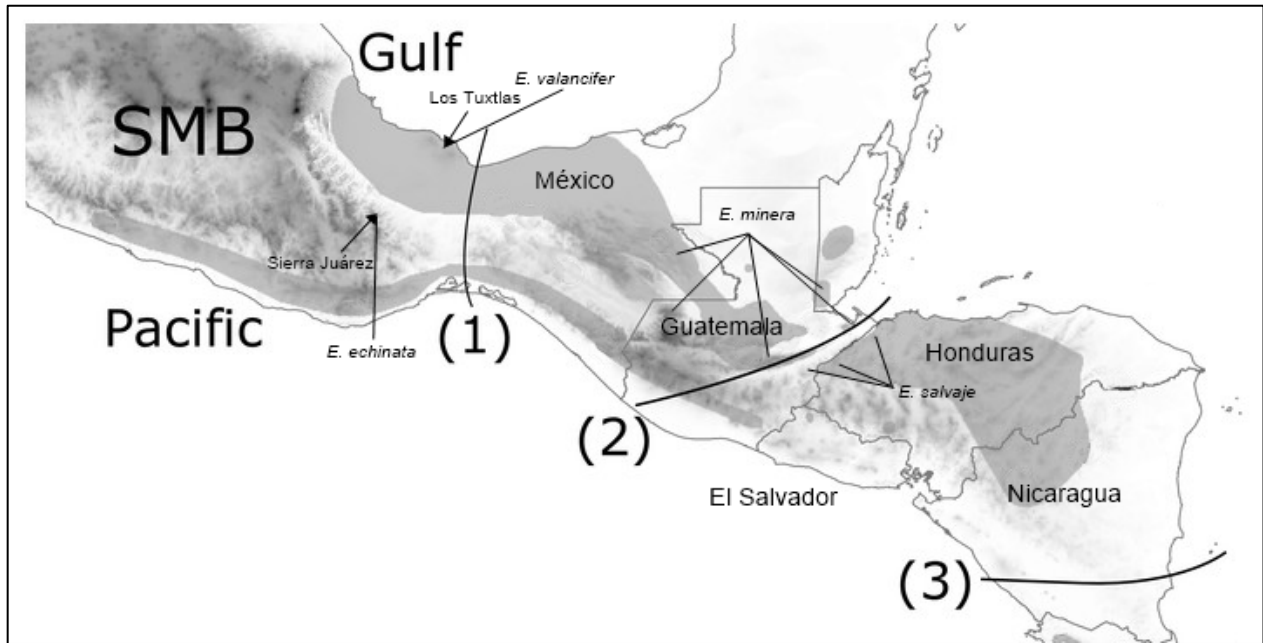


Figura 5. Ubicación de Centroamérica Nuclear y sur de México, en número se muestran las principales barreras geológicas, así como la distribución del género *Ecnomiohyla* en la región, también se muestran algunos puntos de endemismos en el sur de México (Sierra Juárez y Los Tuxtlas). SMB, Bloque del sur de México. Las barreras se numeran de la siguiente manera: 1, Istmo de Tehuantepec, 2, Sistema de fallas Motagua-Polochic-Jocotán (Valle del Motagua), 3, Depresión de Nicaragua. Modificado de Mendoza *et al.*, (2019).

Históricamente, la biogeografía de México es sumamente compleja, siendo reconocida como una Zona de Transición Mexicana donde convergen elementos faunísticos de origen Neártico y Neotropical, lo que ha contribuido a su excepcional riqueza y particularidad (Flores-Villela y Martínez-Salazar, 2009). México alberga una de las herpetofaunas más ricas del mundo, con 374 especies de anfibios (5.32% de la riqueza global) y 854 especies de reptiles (8.75% del total global), y notablemente, aproximadamente el 60% de las especies de ambos grupos son endémicas de México (Ochoa-Ochoa *et al.*, 2014). Las áreas de mayor endemismo para anfibios y reptiles se localizan en las tierras altas de la parte central o sur del país, lo que subraya la estrecha relación entre los patrones de diversidad y las formaciones topográficas a escalas finas, por ejemplo, la Sierra Juárez en Oaxaca es identificada como un centro de alto endemismo para anfibios, mientras que la región de Los Tuxtlas en Veracruz es reconocida por su gran riqueza y endemismo tanto para anfibios como para reptiles (Figura 5) (Ochoa-Ochoa *et al.*, 2014).

Desde una perspectiva herpetofaunística, tanto México como Centroamérica Nuclear son reconocidos como importantes centros de endemismos y diversificación (Johnson *et al.*, 2015). Las profundas divergencias genéticas observadas incluso entre poblaciones de tierras bajas en esta región sugieren la presencia de barreras biogeográficas antiguas y efectivas que han limitado la dispersión y promovido la especiación (Rovito *et al.*, 2012). Numerosos linajes de anfibios y reptiles han evolucionado y se han mantenido aislados en sus sistemas montañosos y bosques nublados fragmentados, lo que ha conducido a patrones de microendemismo muy pronunciados (Rovito *et al.*, 2015). Estos patrones de diversidad y microendemismo, característicos tanto de México como de Centroamérica Nuclear, se ilustran claramente en el género de ranas arborícolas *Ecnomiohyla*. Varias especies presentan distribuciones restringidas a sistemas montañosos específicos de la región, como *E. valancifer* endémica de la región de Los Tuxtlas en Veracruz (Fierschein and Smith, 1956) y *E. echinata* de la Sierra Juárez de Oaxaca (Duellman, 1961). Más hacia el sur *E. minera* es conocida de la Sierra de las Minas, Baja Verapaz, y Sierra de los Cuchumatanes en Huehuetenango, Guatemala (Vásquez-Almazán *et al.*, 2014) y *E. salvaje* se distribuye en la región fronteriza entre Guatemala (Sierra de las Minas) y Honduras en el Parque Nacional Cusuco en San Pedro Sula (Thorp *et al.*, 2021).

La historia geológica de México y la CAN ha jugado un papel fundamental en la configuración de esta diversidad. Estudios filogenéticos de anuros, como los hílidos, demuestran que linajes originados en Sudamérica, como la subfamilia Hylinae, se han diferenciado en una miríada de géneros en Mesoamérica, incluyendo la CAN (Duellman *et al.*, 2016). La elevación de Centroamérica Nuclear y el sur de México por vulcanismo durante el Mioceno coincidió con la diversificación de “stocks” ancestrales de ranas arbóreas, como la división del género de ranas *Plectrohyla* en las tierras altas del norte de Centroamérica y *Sarcohyla* en las tierras altas de México, hace aproximadamente 18.6 millones de años (Duellman *et al.*, 2016).

El estudio de *Dendrotriton*, un género de salamandras de bosque nublado muestra cómo la compleja historia geológica de la CAN ha moldeado su diversificación. La especiación vicariante, más que la peripátrica, parece haber sido el proceso dominante de diversificación para *Dendrotriton*, con la mayoría de los eventos de divergencia ocurriendo dentro o entre áreas montañosas antiguas (Rovito *et al.*, 2012). Ejemplos como *Tripurion spinosus*, una especie de rana que a lo largo de su amplia distribución (desde el sureste de México hasta Honduras) muestra diferencias genéticas significativas, las cuáles sugieren la presencia de diversidad críptica y subraya la complejidad biogeográfica y la importancia de la región para la especiación de la herpetofauna (Faivovich *et al.*, 2018).

En conjunto, estos procesos históricos y geográficos han hecho de las montañas de México y la CAN, junto con otras regiones como la Cuenca del Amazonas, áreas con algunas de las mayores densidades de especies de hilidos, y se continúan descubriendo nuevas especies en estos bosques montanos húmedos (Duellman *et al.*, 2016). La importancia de la CAN para grupos como ranas y salamandras pletodóntidas, que muestran una fuerte asociación con estos ecosistemas específicos, es un claro ejemplo de cómo la historia geológica y la fragmentación de los bosques nublados han sido fuerzas primordiales en la configuración de su diversidad y distribución actual (Rovito *et al.*, 2015).

2.6.2 El Istmo de Tehuantepec como barrera biótica

El Istmo de Tehuantepec (IT), ubicado en el sur de México (Figura 5), es una formación geográfica de particular interés en biogeografía, reconocida por su impacto en la generación de diversidad genética temporal entre especies co-distribuidas (Barber y Klicka, 2010). Este istmo ha actuado como una barrera significativa que influye en la estructura y diversidad genética, así como en los patrones de diferenciación poblacional y vicarianza en múltiples grupos de organismos (González-Porter *et al.*, 2013; Mendoza *et al.*, 2019; Rovito *et al.*, 2012).

La compleja historia geológica de Centroamérica Nuclear y el sur de México ha proporcionado la oportunidad de examinar el efecto de diversas barreras biogeográficas en los procesos de diversificación poblacional (Mendoza *et al.*, 2019; Rovito *et al.*, 2012). En este contexto, el IT es considerado una de las principales rupturas biogeográficas en México, afectando a una variedad de taxones animales (González-Porter *et al.*, 2013). Durante las glaciaciones del Pleistoceno, el Istmo funcionó como barrera para la dispersión de especies, debido a cambios geológicos, climáticos y ambientales significativos (Badillo, 2018).

En anfibios, el Istmo de Tehuantepec ha demostrado ser un factor clave en la diferenciación genética. Estudios en sapos del género *Incilius* han revelado estructuras filogeográficas donde el IT ha propiciado vicarianza y especiación subsecuente (Mulcahy *et al.*, 2006). Para ranas de cristal como *Hyalinobatrachium fleischmanni*, se ha observado que la estructura del clado norte ha sido influenciada por la dispersión a través del Istmo y su aislamiento, con una vicarianza probable durante el Plioceno que originó clados aislados (Mendoza *et al.*, 2019). En salamandras del subgénero *Nanotriton*, el Istmo ha restringido la dispersión de especies adaptadas a ambientes húmedos, aunque ha funcionado como corredor para aquellas adaptadas a ambientes áridos. Además, el IT ha sido identificado como la principal barrera histórica que generó divergencia genética en el complejo *Bolitoglossa rufescens* durante el Plioceno, lo que subraya la importancia del istmo como promotor de especiación. El estudio, que examinó esta especie distribuida a ambos lados de la barrera, ilustra cómo la vicarianza puede crear múltiples linajes genéticos distintos que requieren una revisión taxonómica inmediata (Rovito *et al.*, 2012).

Asimismo, el Istmo ha influido en la diferenciación y distribución de géneros de hílidos (Subfamilia Hyalinae) que se reproducen en arroyos. Un ejemplo notable de esta diversificación en lados opuestos del istmo es el de *Plectrohyla* (18 especies), presente en las tierras altas del norte de Centroamérica (al este del istmo), y *Sarcohyla* (24 especies), en las tierras altas mexicanas (al oeste del istmo); estos géneros se separaron a principios o mediados del Mioceno, hace aproximadamente 18.6 Ma. Otros hílidos afectados incluyen a *Exerodonta*, que se separó del linaje *Plectrohyla-Sarcohyla* a finales del Oligoceno (hace 27.5 Ma), con especies a ambos lados del Istmo, y *Charadrahyla*,

que se diversificó en el sur de México a mediados del Mioceno (hace 15.7 Ma), también con distribución influenciada por esta barrera (Duellman *et al.*, 2016). Los periodos de diversificación de estos linajes coinciden con el vulcanismo del Mioceno que elevó Centroamérica Nuclear y el sur de México (Duellman *et al.*, 2016).

Más allá de los anfibios, el efecto de barrera del Istmo se extiende a otros vertebrados. En el caso de la tortuga de río centroamericana (*Dermatemys mawii*), el Istmo de Tehuantepec y la Sierra de Santa Marta han aislado linajes, resultando en una población genéticamente distintiva en la cuenca del Papaloapan (González-Porter *et al.*, 2013). Para las aves, el IT constituye una barrera geográfica que ha generado dos pulsos discretos de diversificación intraespecífica en aves montañas de México (Barber y Klicka, 2010). Del mismo modo, estudios previos han demostrado que el IT ha sido una barrera para la dispersión y un factor de diferenciación genética para murciélagos, como *Pteronotus davyi*, así como para roedores y serpientes (Badillo, 2018).

Comprender el impacto de barreras biogeográficas, como el Istmo de Tehuantepec, en la estructuración genética y los patrones de diversificación resulta fundamental para entender con mayor claridad los patrones biogeográficos, las relaciones filogenéticas y, en consecuencia, la historia evolutiva de géneros como *Ecnomiohyla* en México, un enfoque ampliamente respaldado en la literatura herpetológica (Duellman, *et al.*, 2016). En este contexto, Chiapas se posiciona como una región clave, al fungir como una zona de transición que concentra elementos neotropicales y neárticos, lo que refuerza su importancia biogeográfica para la herpetofauna (Johnson *et al.*, 2015). Esta dinámica de aislamiento y conexión adquiere especial relevancia en Chiapas, donde la presencia o ausencia de ciertos linajes ha sido motivo de interés por sus implicaciones filogenéticas y biogeográficas.

2.6.3 Chiapas como zona de transición y su relevancia para la herpetofauna

El estado de Chiapas, debido a su particular posición geográfica, compleja orografía e historia biogeográfica, se posiciona como una región clave dentro del territorio mexicano. Su territorio constituye un punto de convergencia entre las regiones Neártica y Neotropical, por lo que se le reconoce como parte de la Zona de Transición Mexicana (Morrone, 2019; Luna-Reyes *et al.*, 2013; Reynoso *et al.*, 2011). En su geografía confluyen seis provincias fisiográficas distintas, lo cual contribuye significativamente a su elevada riqueza biológica (Reynoso *et al.*, 2011).

Desde una perspectiva biótica, Chiapas constituye un área de transición fundamental para la herpetofauna, al conectar las faunas de México con las de Centroamérica (Johnson *et al.*, 2015). Se ha documentado que más de tres cuartas partes de las especies nativas de herpetofauna registradas en el estado son compartidas con Guatemala, lo que subraya su papel como zona de convergencia y facilita el intercambio de elementos faunísticos (Johnson *et al.*, 2015; Muñoz, 2010). Estudios de biogeografía cladística, basado en análisis filogenéticos de diversos taxones, incluidos anfibios y reptiles, han mostrado que las tierras altas de Chiapas y Guatemala conforman un área hermana de la cordillera de Talamanca, en Centroamérica (Miguez-Gutiérrez *et al.*, 2013), lo que refuerza la presencia de linajes compartidos y la influencia neotropical de la región. En este contexto, el Istmo de Tehuantepec, ampliamente reconocido como una barrera biogeográfica significativa, ha actuado como un evento vicariante clave, al aislar el núcleo de Centroamérica y contribuir a la diferenciación de linajes con distintas afinidades faunísticas (Miguez-Gutiérrez *et al.*, 2013). Su influencia es clave para entender la distribución y diversificación de especies en esta zona de contacto.

La región también destaca por la presencia de linajes diferenciados y un alto grado de endemismo. De las 324 especies de herpetofauna registrada en Chiapas, 62 tienen su localidad tipo en el estado, de estas, 33 son endémicas de México con distribución restringida a esta entidad federativa, y 25 se consideran endémicas exclusivas de Chiapas, ya que no se han registrado fuera de sus límites estatales (Reynoso *et al.*, 2011). En particular, la mayoría de los anfibios asociados al bosque mesófilo se caracterizan por ser endémicos, como es el caso de las salamandras *Cryptotriton*

alvarezdeltoroi, *Dendrotriton megarhinus* y *Dendrotriton xolocalcae* (Muñoz-Alonso *et al.*, 2013). También se han documentado especies de ranas arborícolas de tierras altas, como *Plectrohyla*, y de salamandras del género *Bolitoglossa* con distribuciones igualmente restringidas (Muñoz-Alonso *et al.*, 2013).

Esta dinámica de aislamiento y conexión, derivada de las particularidades biogeográficas de Chiapas, adquiere especial relevancia en el estudio de los patrones de distribución y las relaciones filogenéticas de distintos taxones herpetofaunísticos (Miguez-Gutiérrez *et al.*, 2013). Un ejemplo de lo anterior es el caso del género *Ecnomiohyla*.

Históricamente, la distribución conocida del género en México presentaba un vacío en Chiapas (Mendelson *et al.*, 2015). Este aparente vacío distribucional podría deberse a un muestreo insuficiente, limitaciones logísticas o geográficas o bien, a diseños de muestreos no óptimos. El recientemente reporte de *Ecnomiohyla minera* en la Selva Lacandona (Barrio-Amoros *et al.*, 2024), sugiere que la diversidad del género en la región podría ser mayor de la que se había asumido previamente. Este tipo de hallazgos refuerzan la importancia de Chiapas como una zona de transición biogeográfica y resaltan su relevancia en el estudio de los patrones de distribución, diversificación y relaciones filogenéticas en *Ecnomiohyla*.

III.- ANTECEDENTES

La investigación del género *Ecnomiohyla* en México ha enfrentado desafíos relacionados con su distribución, taxonomía y relaciones filogenéticas. Las características propias de las especies, como su distribución restringida, el hábitat en el dosel de bosques y selvas tropicales, aspectos reproductivos del tipo fitotelmata y patrones de coloración críptica, han contribuido a que, en México, muy pocos ejemplares hayan sido reportados desde su descripción (Duellman, 2001; Savage, 2002; Mendelson *et al.*, 2015; Savage y Kubicki, 2010). En la actualidad, los estudios se han limitado principalmente a evaluaciones para la IUCN y la NOM-059, lo cual subraya la necesidad de investigaciones más profundas, particularmente en el ámbito filogenético.

3.1 Distribución del género *Ecnomiohyla* en México

Los reportes de *Ecnomiohyla* en México han sido escasamente documentados, por ejemplo, *E. echinata* solo se conoce de su localidad tipo (Vista Hermosa, Oaxaca) y su último reporte data de 1969 (Mendelson *et al.*, 2015), mientras que *E. valancifer* ha sido reportada en muy pocas ocasiones. Históricamente, la distribución conocida del género *Ecnomiohyla* en México presentaba un vacío notorio en el estado de Chiapas, a pesar de su ubicación geográfica estratégica entre las poblaciones documentadas en Veracruz (*E. valancifer*), Oaxaca (*E. echinata*) y Guatemala (*E. minera* y *E. salvaje*) (Mendelson *et al.*, 2015). Sin embargo, recientemente Barrio-Amorós *et al.*, (2024) reportan la presencia de *Ecnomiohyla minera* en la comunidad de Nahá, Ocosingo, Chiapas. El registro es basado en una hembra adulta capturada al interior de una bromelia, el cual representa el primer y único registro de esta especie para Chiapas y México, cuando solo se conocía en Guatemala (Vázquez-Almazán *et al.*, 2014), la presencia de *E. minera* en el sur de México ya había sido predicho (Duellman, 2001; Mendelson *et al.*, 2015), esto sugiere que la diversidad del género en la región podría ser mayor de la que se había asumido previamente.

3.2 Avances taxonómicos y nuevos registros

Los miembros del género *Ecnomiohyla* se agruparon originalmente en el grupo *Hyla tuberculosa*, también referido como *Hyla miliaria* y estaba compuesto por diez especies (*H. dendrophasma*, *H. echinata*, *H. fimbrimembra*, *H. miliaria*, *H. minera*, *H. phantasmagoria*, *H. salvaje*, *H. thysanota*, *H. tuberculosa* e *H. valancifer*) (Firschein y Smith, 1956; Duellman, 1960, 1961). No obstante, el análisis filogenético de Faivovich *et al.*, (2005), basado en cuatro genes mitocondriales (12S, tRNA valina, 16S, citocromo *b*), demostró la no monofilia del grupo *Hyla miliaria*, e incluyó a *H. miotympanum* como taxón hermano de *H. miliaria*, lo que llevó a la creación del género *Ecnomiohyla* (ranas arborícolas de flecos). Aunque esta denominación buscaba coherencia con una nueva taxonomía monofilética, al no haber material genético disponible en ese estudio solo se incluyeron dos de las diez especies entonces reconocidas (*H. dendrophasma* e *H. miliaria*), sospechando que *Ecnomiohyla tuberculosa* no estuviera relacionada con este grupo.

La definición de grupos de especies dentro de *Ecnomiohyla* ha sido una constante. Savage y Kubicky (2010) propusieron agrupaciones basadas en características morfológicas, distinguiendo tres grupos, sin embargo, estas fueron consideradas “agrupaciones por similitud” que carecían de evidencia clara de monofilia. Posteriormente, Mendelson *et al.*, (2015) realizaron una revisión taxonómica de las especies de *Ecnomiohyla* distribuidas en México y el Núcleo Centroamericano (Guatemala y Belice), aportando nuevas descripciones diagnósticas, mapas de distribución y comentarios sobre su estatus taxonómico actual. Además, sugirieron la probable presencia de *E. minera* de Guatemala en el sur de México, y comentaron que la población de Belice tentativamente asignada a *E. valancifer* podría tratarse de una especie no descrita.

En 2017, a través del proyecto “Ecología reproductiva de *Ecnomiohyla valancifer*” desarrollado por ECOSUR, el autor de esta tesis registró un ejemplar de *Ecnomiohyla* sp. en la ZSCE La Pera (Berriozábal, Chiapas, México). Las características morfológicas de este ejemplar no permitieron identificarlo hasta el nivel de especie y difieren de las especies conocidas en México (*E. echinata* y *E. valancifer*) y Centroamérica, lo que llevó a su designación temporal como *Ecnomiohyla* sp. – La Pera (datos no publicados). Desde entonces, esta población ha sido monitoreada continuamente por el mismo equipo del proyecto antes mencionado.

3.3 Filogenia y estudios moleculares

Si bien los estudios taxonómicos sobre *Ecnomiohyla* son limitados, las investigaciones que aportan datos moleculares son aún más escasos, incluso no hay estudios moleculares que involucren específicamente a las especies distribuidas en México. Los pocos trabajos con datos moleculares suelen integrar especies centroamericanas (Costa Rica y Panamá), y la especie con distribución más norteña en estos estudios es *E. minera*.

Análisis pioneros como el de Faivovich *et al.*, (2005), que llevó a la creación del género *Ecnomiohyla* (ver apartado 3.2), sentaron las bases para la comprensión de sus relaciones filogenéticas. Sin embargo, estudios filogenéticos posteriores, como los de Wiens *et al.*, (2010) y Pyron y Wiens (2011) basados en genes mitocondriales (12S, 16S y citocromo *b*) y nucleares (RAG-1, rhodopsin, SIA, tirosina y 28S), sugirieron que *Ecnomiohyla* podría no ser monofilético, aunque esta suposición no estuvo fuertemente soportada. En estos estudios, se incluyeron a *E. miliaria*, *E. minera* y *E. miotympanum*, esta última se anidó como taxón hermano de *Ptychohyla*, y se presume que la secuencia de *E. minera* incluida en sus análisis podría corresponder a una *E. miliaria* mal identificada, dada la identidad de sus secuencias de ADN.

Contrariamente a estos hallazgos, Batista *et al.*, (2014), utilizando un fragmento del gen mitocondrial 16S y datos morfológicos, describieron a *E. bailarina* y *E. veraguensis*. Su análisis, que incluyó seis de las 14 especies del género, arrojó dos clados bien soportados y confirmó la monofilia de los miembros del género para los que se tenían datos disponibles, en uno de los clados se agrupó a *E. fimbrimembra* como especie hermana de *E. rabborum* y *E. bailarina*, y el segundo clado tiene a *E. miliaria* como la especie hermana de *E. sukia* y *E. veraguensis*, además de obtener a *E. miotympanum* como un clado hermano con las demás especies disponibles de *Ecnomiohyla*. Posteriormente, Duellman *et al.*, (2016) presentaron una nueva filogenia molecular de ranas arborícolas basada en una gran cantidad de taxones y genes; en su estudio incluyó a *E. rabborum*, *E. miliaria*, *E. minera* y *E. miotympanum*, las primeras tres se anidaron juntas, mientras que *E. miotympanum* mostró una larga rama bien soportada, lo que motivó la creación del género monotípico *Rheohyla* para esta última especie. Adicionalmente, con la finalidad de inferir la posición filogenética de *E. tuberculosa*, Ron *et al.*, (2016) realizaron un análisis filogenético usando los genes mitocondriales 12S, 16S y COI, sus resultados demostraron sólidamente la inclusión de *E. tuberculosa* en el género *Tepuihyla*.

Finalmente, Faivovich *et al.*, (2018) realizaron un análisis molecular con el objetivo de discutir la monofilia de varios géneros de la familia Hylidae, incluyendo *Ecnomiohyla*. Sus resultados corroboraron la monofilia de *Ecnomiohyla*, incluyendo siete de las 12 especies descritas hasta la fecha, lo que constituyó el estudio filogenético molecular más extenso del género hasta ese momento. Resaltaron que la inclusión en futuros análisis filogenéticos de las cinco especies restantes de *Ecnomiohyla* (*E. echinata*, *E. phantasmagoria*, *E. salvaje*, *E. thysanota* y *E. valancifer*) permitirá una comprensión mucho mejor de la evolución de este grupo de ranas.

IV.- HIPÓTESIS

Dada la posición biogeográfica de Chiapas en Centroamérica Nuclear y el papel del Istmo de Tehuantepec como barrera biótica, nuestra hipótesis es que la población de *Ecnomiohyla* sp. – La Pera estará más emparentada con las especies de Centroamérica.

V.- OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar las relaciones filogenéticas de las poblaciones del género *Ecnomiohyla* en México.

5.2 Objetivos particulares

- Delimitar las especies de *Ecnomiohyla* en México con base en la inferencia filogenética.
- Describir los posibles procesos de especiación y las relaciones filogenéticas que han repercutido en la divergencia de las especies del género *Ecnomiohyla* en el sur-sureste de México.
- Proponer nuevas diagnósis y comparaciones entre las especies de *Ecnomiohyla*.

VI.- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención de muestras.

6.1.1 Especies de *Ecnomiohyla* con distribución en México.

En este estudio se consideraron las tres especies reconocidas en México y la población de *Ecnomiohyla* sp. – La Pera. Sin embargo, *E. echinata* no ha sido reportada en varias décadas; su último registro fechado fue en 1969 (Mendelson *et al.*, 2015). Con el objetivo de obtener registros y muestras para estudios genéticos, se llevó a cabo un muestreo en la localidad tipo (Comunidad Vista Hermosa, Santiago Comaltepec, Oaxaca), ubicada entre los paralelos 17°37'42.00"N y 96°22'5.46"O, a 28 km al suroeste de San Juan Bautista Valle Nacional, Oaxaca. El muestreo fue realizado por un equipo de tres personas, mediante recorridos no sistemáticos, intensivos y de dirección y extensión variable dentro de la zona de la localidad tipo. Se realizó una inversión diaria de seis horas-hombre (18:00 a 00:00 h) durante siete días en el mes más lluvioso (septiembre) de los años 2023 y 2024, lo que representó un esfuerzo total de 252 horas-hombre. La selección de los periodos de muestreo se basó en los meses de mayor actividad reproductiva documentados para otras especies del género *Ecnomiohyla* y para anuros tropicales con hábitos similares, considerando que no existen registros específicos sobre la fenología reproductiva de *E. echinata*.

Para el caso de *E. valancifer* (Veracruz) y *Ecnomiohyla* sp. – La Pera, se realizaron múltiples muestreos en las localidades Adolfo Ruiz Cortines de la RB Los Tuxtlas (para *E. valancifer*), así como en la ZSCE La Pera (para *Ecnomiohyla* sp. – La Pera) (Cuadro 1). Con un equipo de tres personas, se efectuaron muestreos no sistemáticos, intensivos y de extensión y dirección variable, efectuando una inversión diaria de seis horas-hombre (18:00 a 00:00 h) durante tres días, en los meses más lluviosos (junio a octubre) de los años 2023 y 2024. Esto resultó en un esfuerzo total de 540 horas-hombre.

Aunado a lo anterior y debido a que las especies del género *Ecnomiohyla* presentan hábitos arborícolas extremos, habitando principalmente en el dosel, durante los recorridos se implementó un método alternativo basado en la reproducción de cantos de machos y hembras grabados previamente. Este método fue denominado “Estaciones de Muestreos Auditivos” (EMA’s), y los audios utilizados fueron proporcionados por el Museo de Historia Natural de Senckenberg. Estas vocalizaciones fueron reproducidas en sitios potenciales mediante bocinas portátiles, lo que permitió inducir respuestas acústicas de machos y hembras presentes en el área, lo cual facilitó estimar la presencia y ubicación aproximada de individuos. Se intentó la captura de los individuos detectados; sin embargo, los machos permanecieron vocalizando desde cavidades u otras estructuras elevadas, impidiendo su captura directa. Por otro lado, se observó que las hembras respondieron al estímulo auditivo aproximándose a la fuente de sonido y emitiendo una vocalización de baja intensidad, lo que facilitó su detección visual y posterior captura.

Se colectaron cinco ejemplares: dos de *E. valancifer* y tres de *Ecnomiohyla* sp. – La Pera (permiso de colecta número: SPARN/DGVVS/12614/23). Los especímenes fueron ingresados a la Colección Herpetológica de El Colegio de la Frontera Sur, Unidad San Cristóbal de las Casas, Chiapas y catalogados bajo la siguiente nomenclatura: ECO-SCH-4855, ECO-SCH-4856 para *E. valancifer* y ECO-SCH-4854, ECO-SCH-4859, ECO-SCH-2862 para *Ecnomiohyla* sp. – La Pera.

Para el caso de *E. minera*, de la localidad de Nahá, el tejido provino del ejemplar colectado por Barrio-Amorós *et al.*, (2024) e ingresado a la Colección Herpetológica del Museo de Zoología “Alfonso L. Herrera”, de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, con el número de catálogo MZFC-36211.

6.1.2 Otras especies de *Ecnomiohyla*

Para maximizar la representatividad filogenética del género y evaluar la posible monofilia o diferenciación de los linajes mexicanos, se incluyeron las especies *E. minera* y *E. salvaje* con muestras provenientes de Guatemala. Los tejidos de *E. minera* y *E. salvaje* fueron procedentes de los ejemplares con número de catálogo USAC-3475, USAC-4433 para *E. minera* y USAC-4434, USAC-4435 para *E. salvaje*, resguardados en la Colección Herpetológica del Museo de Historia Natural de la Universidad de San Carlos, Guatemala. También se incluyeron las siguientes especies: *E. rabborum*, *E. bailarina*, *E. fimbrimembra*, *E. sukia*, *E. veraguensis* y *E. miliaria*. Las secuencias de estas especies se obtuvieron de GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y forman parte del estudio de Batista *et al.*, (2014), los autores emplearon un fragmento del gen mitocondrial 16S utilizando el siguiente cebador: forward (L2510, 5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'); reverse (H3056, 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'). Estas especies se distribuyen en Costa Rica y Panamá (Figura 4B). Las especies *E. thysanota* y *E. phantasmagoria* no fueron consideradas debido a la falta de datos moleculares disponibles.

6.1.3 Selección del grupo externo.

En este estudio usamos *Rheohyla miotympanum* (Cope, 1863) como grupo externo, por ser la especie filogenéticamente más cercana a *Ecnomiohyla* de acuerdo con Duellman *et al.*, (2016) y Faivovich *et al.*, (2018). Las secuencias usadas fueron las mismas que utilizó Batista *et al.*, (2014) y fueron descargadas de GenBank.

6.2 Obtención de las secuencias

Todo el trabajo de extracción y amplificación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular (LIDiaM) de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.

6.2.1 Extracción de Ácido desoxirribonucleico (DNA)

Se extrajo ADN total de hígado preservado en alcohol absoluto. Se utilizó el protocolo basado en el método de extracción por lisis celular-fenol-cloroformo (Sambrook *et al.*, 1989). Se maceró un trozo de tejido de aproximadamente 2 mm de diámetro y se homogeneizó en 360 µL de EDTA pH 8.0, 13 µL de SDS al 10%, 25 µL de Tris HCL 0.1 M y 13 µL de proteinasa K. Esta mezcla se mantuvo agitada a 56°C por todo un día hasta la dilución completa del tejido. Posteriormente, se realizó una extracción fenólica de acuerdo con el siguiente protocolo: se añadió sobre la mezcla anterior 500 µL de una mezcla de fenol + cloroformo, se agitó por 20 segundos en vortex y se centrifugó por un minuto a 14 000 rpm. Luego se trasladó el sobrenadante a una segunda serie de tubos y se le añadió 500 µL de cloroformo, nuevamente se agitó por 20 segundos en vortex y se centrifugó por un minuto a 14 000 rpm. Finalmente, se volvió a trasladar el sobrenadante a una tercera serie de tubos y para precipitar el ADN se añadieron 700 µL de alcohol frío (100 %) y se dejó precipitar en el congelador por una noche.

Con la finalidad de eliminar el exceso de sales, los tubos se centrifugaron por 10 minutos a 13 200 rpm a 4°C, a continuación, se decantó el alcohol en un vaso de precipitado cuidando de no tirar el botón blanco. Luego se añadieron 700 µL de alcohol frío al 70% y nuevamente se centrifugaron por 10 minutos a 13 200 rpm a 4°C, se volvió a decantar el alcohol y los tubos fueron colocados boca abajo para evaporar los restos de alcohol. Finalmente, se re-suspendió en 50 µL de agua esterilizada para posteriormente almacenar en el enfriador. La calidad y cantidad de ADN total fueron examinadas en un espectrofotómetro marca Eppendorf BioSpectrometer® basic.

6.2.2 Elección de los genes.

En el presente estudio, se utilizó un segmento del gen ribosomal 16S como marcador filogenético. La decisión de emplear únicamente este gen se basó en el estudio de Batista *et al.*, (2014), quién utilizó el mismo fragmento para evaluar eventos de divergencia a nivel intra e interespecífico, describiendo dos nuevas especies y reconstruyendo la filogenia de los miembros del género para los cuales contaron con material disponible. Al emplear el mismo marcador y fragmento, se garantiza la homogeneidad de los datos y la

comparabilidad de las secuencias de las especies estudiadas con los linajes previamente definidos por Batista *et al.*, (2014). Además, el nivel de variación observada en este gen ha sido útil para estudios filogenéticos en anfibios, tanto a nivel intraespecífico (Batista *et al.*, 2014) como interespecífico (Faivovich *et al.*, 2005, 2018; Wiens *et al.*, 2010; Pyron y Wiens, 2011; Duellman *et al.*, 2016). Finalmente, en la discusión se abordan las posibles implicaciones de esta elección y se sugieren líneas para futuros estudios con más loci.

6.2.3 Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se amplificó mediante PCR un fragmento del gen 16S utilizando el siguiente cebador: Forward L2510, 5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'; Reverse H3056, 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3' (Batista *et al.*, 2014). La mezcla de PCR fue la siguiente (25 µL de volumen total): 16.8 µL de agua libre de nucleasas; 5.0 µL de búffer de amplificación 10X; 1.0 µL de cebador forward y 1.0 µL de reverse; 0.2 µL de Taq polimerasa y 1.0 µL de DNA total. La reacción se llevó a cabo con el siguiente perfil térmico: tres minutos de desnaturalización inicial a 94°C, 35 ciclos de 40 segundos de desnaturalización a 94°C, 45 segundos de alineamiento a 48°C, un minuto de extensión a 72°C y siete minutos de extensión final a 72°C. En todos los casos se realizaron controles positivos (con DNA amplificado anteriormente) y controles negativos (con agua en lugar de DNA). La calidad e intensidad de los productos de PCR se examinaron en geles de agarosa al 2%.

6.2.4 Purificación y secuenciación

Los productos de PCR obtenidos fueron enviados para su purificación y secuenciación al Laboratorio de Secuenciación Genómica (LSG) del Instituto de Biología, UNAM. De acuerdo con el laboratorio, el método de purificación empleado fue mediante enzimas y el utilizado para la reacción de secuencia fue Kit BigDye Terminator v. 3.1 (Applied Biosystems, USA), con modificaciones validadas en el LSG (LNB-LSG-P03). El fragmento del gen 16S fue secuenciado en un sentido (forward) y los resultados de la secuenciación fueron visualizados en forma de electroferograma, en donde cada señal corresponde a una de las bases nucleotídicas de la secuencia. Se obtuvieron secuencias del gen 16S de uno a dos ejemplares por especie (Cuadro 1).

6.3 Edición y comparación de las secuencias

Los electroferogramas de cada secuencia fueron editados con el programa MEGA versión 11 (Tamura *et al.*, 2021) y posteriormente fueron comparados con secuencias de GenBank, utilizando la herramienta BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”) para establecer si los productos secuenciados correspondían al gen mitocondrial 16S y correspondan a ranas del género *Ecnomiohyla*. Las secuencias de cada gen fueron alineadas usando el programa MEGA mediante el algoritmo de Muscle.

6.4 Reconstrucciones filogenéticas

Para determinar el modelo de sustitución nucleotídica que mejor se ajuste a los datos se utilizó el programa Jmodeltest (Posada, 2008). El programa analiza 88 modelos de sustitución, el modelo con el menor valor de cada criterio es el de mejor ajuste, los criterios de información implementados en este programa son el criterio de información de Akaike (AIC) y su corrección para muestras finitas (AICc) y el criterio Bayesiano (BIC). Para este estudio se aplicó el criterio de información de Akaike (AIC), por ser el más adecuado de acuerdo con su fundamento teórico.

Se realizaron reconstrucciones filogenéticas utilizando dos métodos: Máxima verosimilitud y Análisis Bayesiano de probabilidades posteriores (MV y BI respectivamente), utilizando el programa MEGA versión 11 para el primer caso y Mr. Bayes 3.2.7 para el segundo; en ambos análisis se utilizó el modelo de sustitución nucleotídica GTR (General Time Reversible) y la distribución gamma con sitios invariantes (GTR+G+I) con cuatro categorías de variación, recomendadas por el programa JModeltest. En MEGA 11 se calcularon distancias genéticas por pares no corregidas con 1000 réplicas de bootstrap antes de los análisis de máxima verosimilitud y bayesiano.

Para el análisis de máxima verosimilitud se optó por un análisis de bootstrap no paramétrico con 1 000 pseudo-réplicas, las cuáles se consideran suficientes para un adecuado soporte estadístico en los análisis de distancia (Batzoglou *et al.*, 2009). La búsqueda del árbol de mayor verosimilitud fue con el método heurístico Subtree Pruning and Regrafting (SPR), por ser una alternativa de mayor alcance al poder explorar una

gama más amplia de configuraciones con respecto a otros métodos, por ejemplo, el Nearest Neighbor Interchange (NNI).

El análisis bayesiano se ejecutó bajo el modelo antes mencionado (GTR+G+I) para 2,000,000 de generaciones y se muestreó cada 100, para cuatro cadenas de Markov (MCMC), descartando el primer 5% como burn-in para obtener la convergencia del análisis, que se alcanza cuando el valor de la desviación estándar de las frecuencias partidas (SDSF) se encuentra entre 0.05 y 0.01. En el análisis se obtuvo una SDSF de 0.002, lo que indica una correcta convergencia (Ronquist y Huelsenbeck, 2003).

Cuadro 1. Especímenes utilizados para la obtención de secuencias mencionados en el texto. Aquellos con acceso a GenBank fueron generados por el estudio de Batista *et al.*, (2014).

Número de catálogo	Acceso a GenBank	Especie	Localidad	País	Latitud	Longitud	Elevación
ECO-SCH-4854		<i>Ecnomiophyla sp</i>	ZSCE La Pera	México	16.86041	-93.33479	1 200
ECO-SCH-4859		<i>Ecnomiophyla sp</i>	ZSCE La Pera	México	16.86126	-93.33513	1 184
ECO-SCH-4856		<i>E. valancifer</i>	Ruiz Cortines, RB Los Tuxtlas	México	18.54189	-95.14424	1 058
ECO-SCH-4855		<i>E. valancifer</i>	Ruiz Cortines, RB Los Tuxtlas	México	18.54203	-95.14422	1 060
MZFC-HE-36211		<i>E. minera</i>	Nahá, Ocosingo, Chiapas	México	16.97444	-91.57166	1 058
USAC-3475		<i>E. minera</i>	Santa Cruz Barilla, Huehuetenango	Guatemala	15.87341	-91.24007	1 205
USAC-4433		<i>E. minera</i>	Puerto Barrios, Izabal	Guatemala	15.683482	-88.66886	625
USAC-4434		<i>E. salvaje</i>	La Unión, Zacapa	Guatemala	14.948816	-89.277443	1 522
USAC-4435		<i>E. salvaje</i>	La Unión, Zacapa	Guatemala	14.948816	-89.277443	1 522
SMF97398	KF924240	<i>E. bailarina</i>	Sambú, Comarca Emberá	Panamá	7.70903	-78.04882	750
SMF 89857	KF924242	<i>E. fimbriemembra</i>	Mono Sendero La Cascada	Panamá	8.82629	-82.49907	1 820
SIUC 6998	AY843777.1	<i>E. miliaria</i>	El Copé, PN Omar Torrijos	Panamá	8.667	-80.592	800
KRL758	DQ055824	<i>E. miliaria</i>	El Copé, PN Omar Torrijos	Panamá	8.667	-80.592	800
EVACC092	KC014814.1	<i>E. miliaria</i>	Chagres National Park	Panamá	9.31985	-79.2889	818
EVACC191	KC014813.1	<i>E. rabborum</i>	El Valle, Río María	Panamá	8.63312	-80.0767	990
EVACC189	KC014811.1	<i>E. rabborum</i>	El Valle, Río María	Panamá	8.63312	-80.0767	990
EVACC195	KC014809.1	<i>E. rabborum</i>	El Valle, Río María	Panamá	8.63312	-80.0767	990
EVACC193	KC014807.1	<i>E. rabborum</i>	El Valle, Río María	Panamá	8.63312	-80.0767	990
EVACC190	KC014812.1	<i>E. rabborum</i>	El Valle, Río María	Panamá	8.63312	-80.0767	990
SMF94578	KF924239	<i>E. sukia</i>	San Carlos, Cerro Chato, Alajuela	Costa Rica	10.2632	-84.4052	922
SMF89877	KF924241	<i>E. varaguensis</i>	Cerro Negro/PN Santa Fe	Panamá	8.5533	-81.09261	540
JAC22438	AY843645.1	<i>R. miotympanum</i>	Sierra Norte, Cuetzalan, Puebla	México			1 250

6.5 Redescripción y diagnosis

Se realizaron nuevas descripciones de las especies de *Ecnomiohyla* para las que fue posible examinar físicamente a uno o varios ejemplares. La diagnosis y descripción de los ejemplares siguieron la terminología y el formato de Mendelson *et al.*, (2008), Duellman (2001) y Watters *et al.*, (2016); para la formula membranial se siguió el sistema de Savage (2002); las siguientes medidas morfométricas fueron tomadas con un vernier digital a 0.1 mm: longitud hocico-cloaca (LCH), largo de la pata (LP), largo de la cabeza (LC), diámetro de tímpano (DT), largo de la pierna (Lpi), distancia interorbital (DI), ancho de la cabeza (AC), largo de la mano (LM), largo del antebrazo (LA), largo de la tibia (LT), diámetro del ojo (DO), distancia internarial (Din), largo del húmero (LH). El sexo de los especímenes se determinó mediante la evaluación de caracteres sexuales secundarios (presencia-ausencia de proyección humeral, excrescencias nupciales y sacos vocales) y/o examinación directa de gónadas.

Para el caso de *E. valancifer* y *Ecnomiohyla* sp. – La Pera, los datos morfométricos fueron obtenidos de muestreos previos relacionados con la población de *Ecnomiohyla* sp. – La Pera (ver sección 3.2 de Antecedentes), así como del proyecto “Ecología reproductiva de la rana *Ecnomiohyla valancifer*”, desarrollado en conjunto entre el Museo de Historia Natural de Senckenberg, Frankfurt, Alemania y El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Unidad San Cristóbal, Chiapas, México. Estos datos previos se complementaron con los obtenidos del trabajo de campo y de laboratorio derivados de este estudio. La información morfométrica proviene de ejemplares vivos capturados y medidos en el campo mediante el método denominado EMA's, descrito anteriormente. Adicionalmente, se visitó la Colección Herpetológica del Ecosur Unidad San Cristóbal, con el fin de revisar y registrar medidas de los ejemplares previamente mencionados. En el caso de *E. minera* de la localidad de Nahá, se visitó la Colección Herpetológica del Museo de Zoología Alfonso L. Herrera de la Facultad de Ciencias, para poder examinar físicamente al ejemplar capturado por Barrio-Amorós *et al.*, (2024) cuyo número de catálogo es MZFC-36211. *E. minera* y *E. salvaje* de Guatemala fueron examinados físicamente en las instalaciones de la Colección Herpetológica del Museo de Historia Natural de la Universidad de San Carlos, Guatemala, y cuyos números de catalogo ya

fueron mencionados. Todas las imágenes presentadas en las figuras que no indiquen autoría corresponden a material fotográfico obtenido por el autor de este trabajo (Luis J. Caloca).

VII.- RESULTADOS

A pesar del esfuerzo de muestreo intensivo realizado en la localidad tipo de *Ecnomiohyla echinata*, empleando los dos métodos descritos en la sección 6.1.1 (EMA's y Recorridos no sistemáticos) durante los periodos de mayor actividad reproductiva observados en otras especies de *Ecnomiohyla* y anuros tropicales afines, no se registró ningún individuo de esta especie. En la zona aún persisten hábitats aparentemente adecuados (Figura 6), con cobertura vegetal continua y condiciones ambientales favorables. Sin embargo, *E. echinata* no fue detectada en los muestreos de este estudio y, debido a la ausencia de material genético reciente, no se incluyó en los análisis filogenéticos.

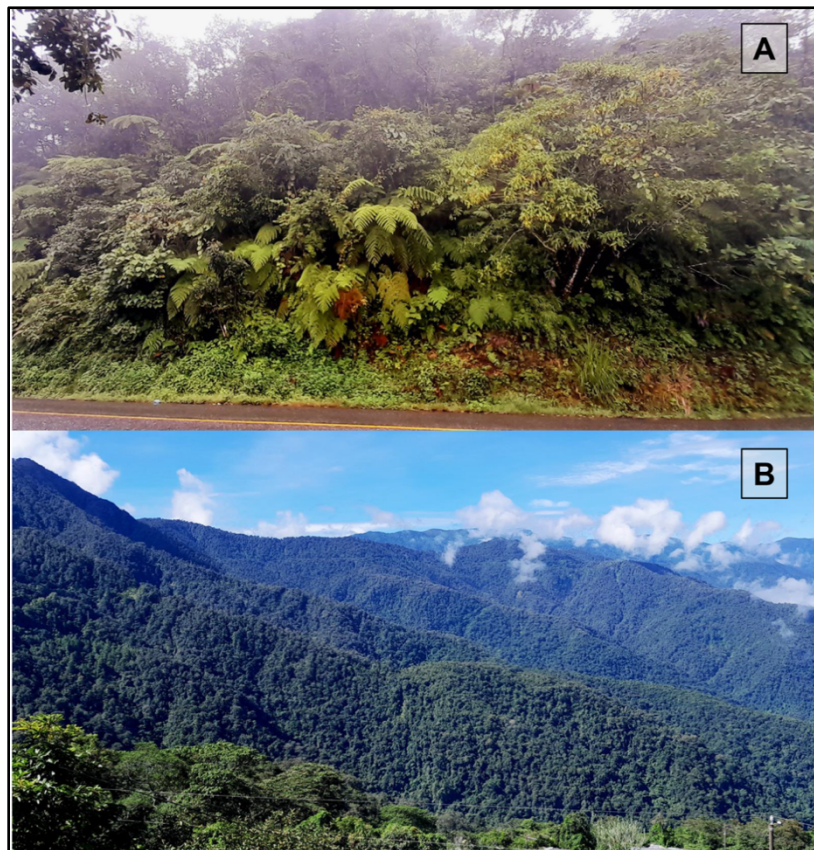


Figura 6. Hábitat de la localidad tipo de *E. echinata*. A) Remanentes de bosque mesófilo de montaña a 1 600 msnm. B) Vista panorámica de la Sierra Juárez de Oaxaca desde la localidad tipo.

7.1 Reconstrucciones filogenéticas

En este análisis se incluyeron nueve de las 12 especies que componen el género *Ecnomiohyla*. Los análisis realizados mediante inferencia bayesiana (BI) y máxima verosimilitud (MV), produjeron topologías muy similares, con mínimas diferencias, resolviendo satisfactoriamente la mayoría de las relaciones entre las especies del género. Esto se refleja en los altos valores de soporte estadístico, Probabilidad Posterior (PP) y Bootstrap no paramétrico (BS) observados en la mayoría de las ramas (Figura 7 y 8). Dado que las topologías no fueron idénticas, se presentan por separado los árboles obtenidos por cada método, conservando la información específica de los valores de soporte en cada análisis.

Las secuencias analizadas permitieron reconocer 10 linajes genéticamente diferenciados dentro del conjunto de muestras analizadas (Figura 7 y 8), las distancias pareadas genéticas entre especies que oscilaron entre 3% y 13% (Anexo 1). En ambos análisis (MV y BI), las secuencias correspondientes a las poblaciones de *Ecnomiohyla* sp. – La Pera y *E. minera* de Nahá formaron un clado altamente soportado (100 BS, 100 PP) y claramente separado del resto de las especies incluidas. Adicionalmente, no presentaron afinidades morfológicas que permitieran su asignación a alguna especie previamente descrita del género. Las distancias genéticas entre este clado y su grupo más cercano, *E. valancifer*, fueron de 3.3% y 3.7% (Anexo 1), mientras que entre poblaciones de La Pera y Nahá se observaron distancias de 0.4% y 0.8% (Anexo 1). Con base en estos resultados, ambas poblaciones se tratarán en este estudio como una misma unidad taxonómica. La muestra proveniente de Nahá, Ocosingo, Chiapas, por tanto, no corresponde a un ejemplar de *E. minera*, sino a la misma entidad biológica que *Ecnomiohyla* sp. – La Pera. En consecuencia, y para efectos de este estudio, el género *Ecnomiohyla* queda representado por 13 linajes, y las poblaciones chiapanecas serán referidas desde este punto como *Ecnomiohyla* sp. nov.

7.1.1 Topología del análisis Bayesiano de probabilidades posteriores

El árbol obtenido mediante inferencia bayesiana muestra una separación basal de dos grupos monofiléticos bien soportados (100 PP) (Figura 7). Por un lado, se encuentra el clado A, conformado por las especies *Ecnomiohyla sp. nov.*, *E. valancifer*, *E. salvaje*, *E. minera*, *E. miliaria*, *E. sukia* y *E. veraguensis*. Por otro lado, el clado B agrupa las especies *E. fimbrimembra*, *E. bailarina* y *E. rabborum*.

Dentro del clado A se recuperan dos grupos fuertemente soportados (91 PP). El primero de ellos muestra una politomía en su base e incluye tres clados bien definidos (89 PP): el primero conformado por *Ecnomiohyla sp. nov.* y *E. valancifer*; el segundo por *E. salvaje* y *E. minera*; y el tercero formado únicamente por *E. miliaria*. Este clado no es completamente congruente con el patrón de distribución, ya que mientras *Ecnomiohyla sp. nov.*, *E. valancifer*, *E. salvaje* y *E. minera* se distribuyen en el norte de Centroamérica (Honduras, Guatemala y México), las secuencias de *E. miliaria* utilizadas en este estudio provienen de Panamá (Cuadro 1). Sin embargo, la filogenia del análisis BI la posiciona como una especie cercana a las del norte de Centroamérica.

El segundo grupo que da forma al clado A está compuesto por *E. veraguensis* y *E. sukia*, que también forman un clado bien resuelto con soporte alto (96 PP). El posicionamiento de *Ecnomiohyla sp. nov.* dentro del género tuvo un alto soporte (100 PP) (Figura 7), siendo la especie hermana de *E. valancifer*, mientras que *E. salvaje* es la especie hermana de *E. minera*, y a su vez, estas son hermanas de *E. miliaria*. Finalmente *E. veraguensis* y *E. sukia* también representan especies hermanas entre sí.

El clado B presenta una filogenia resuelta para las especies que lo componen (*E. fimbrimembra*, *E. bailarina* y *E. rabborum*), con altos valores de probabilidad posterior (66 PP, 85 PP, 100 PP). La filogenia muestra que *E. fimbrimembra* es la especie hermana de *E. bailarina* y ambas son hermanas de *E. rabborum* (Figura 7).

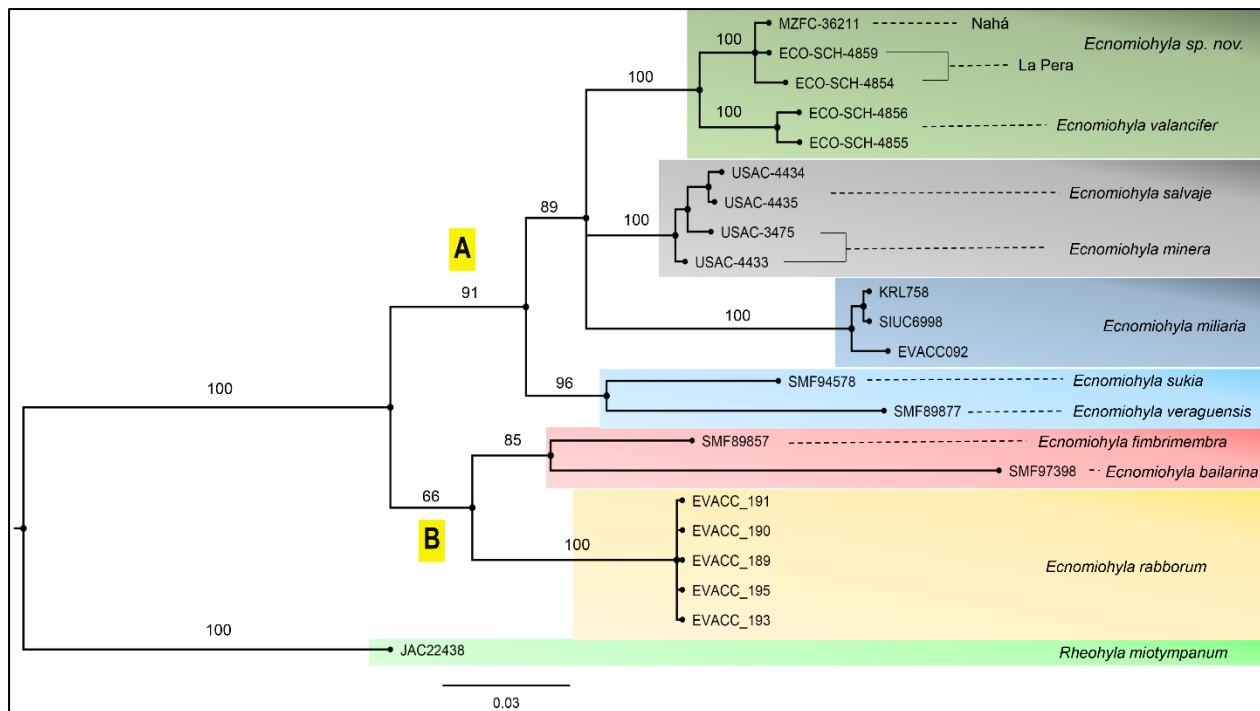


Figura 7. Filogenia del género *Ecnomiohylla* reconstruida por medio de análisis Bayesiano bajo el modelo GTR+G+I y basado en las secuencias del gen mitocondrial 16S. El soporte estadístico se indica con los valores de probabilidades posteriores ubicados encima de las ramas. Se indican los clados A y B referidos en el texto.

7.1.2 Topología del análisis de Máxima Verosimilitud

El análisis de Máxima Verosimilitud (MV) recuperó una filogenia con topología general congruente con la obtenida mediante inferencia bayesiana, aunque con valores de soporte variables entre los nodos (Figura 8). Algunos nodos basales del árbol mostraron bajos valores de bootstrap no paramétrico (37 BS) (soporte estadístico), lo cual sugiere una limitación en la señal filogenética del marcador para resolver las relaciones en los niveles más profundos de la filogenia.

En contraste, la mayoría de los nodos de las ramas terminales estuvieron bien soportados, destacando la recuperación de agrupamientos previamente observados en el análisis de BI, como los clados formados por *Ecnomiohylla sp. nov.* y *E. valancifer*, así como por *E. salvaje* y *E. minera*. Ambos clados presentaron valores de soporte elevados (100 BS, 99 BS), lo que refuerza la solidez de estas relaciones filogenéticas dentro del género. Al igual que en el análisis bayesiano, *E. miliaria* fue posicionada como una

especie estrechamente relacionada con las especies distribuidas en el norte de Centroamérica (Figura 8).

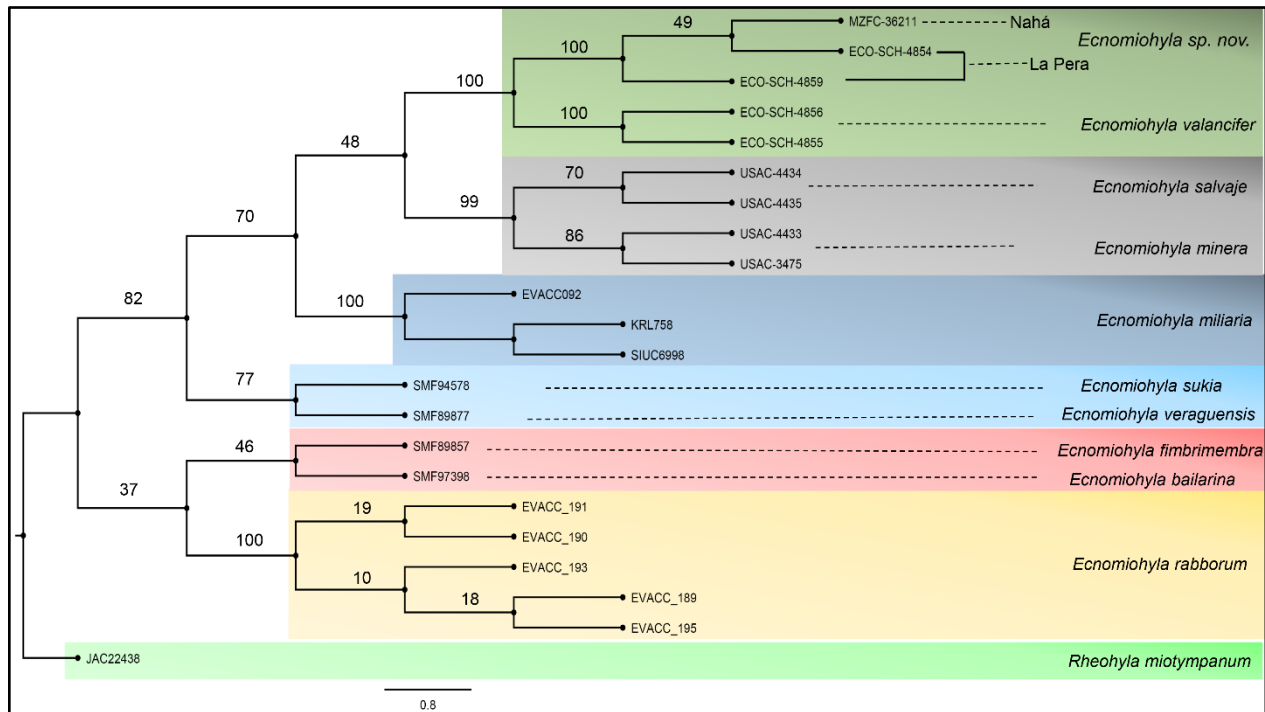


Figura 8. Filogenia del género *Ecnomiohyla* reconstruida por medio del análisis de Máxima verosimilitud bajo el modelo GTR+G+I y basado en las secuencias del gen mitocondrial 16S. El soporte estadístico se indica con los valores del bootstrap no paramétrico (1 000 pseudo-replicas) ubicados encima de las ramas.

7.2 Diagnósis y análisis de los especímenes

Las siguientes descripciones morfológicas corresponden a ejemplares revisados físicamente durante este estudio, procedentes de las siguientes localidades: La Pera y Nahá (*Ecnomiohyla* sp. nov.), RB Los Tuxtlas (*E. valancifer*), Santa Cruz Barilla (*E. minera*), La Unión (*E. salvaje*) (Cuadro 1). Estas descripciones detallan los caracteres morfológicos diagnósticos que refuerzan la delimitación de las especies, conforme a los resultados filogenéticos obtenidos.

***Ecnomiohyla valancifer* (Firschein and Smith, 1956)**

(Figuras 9 y 10)

Hembras: 11; Machos: 0

Hyla valancifer — Firschein and Smith, 1956.

Ecnomiohyla valancifer — Faivovich, Haddad, Garcia, Frost,
Campbell, and Wheeler, 2005.

Aunque no fue posible observar ni capturar ejemplares machos, las vocalizaciones registradas durante el trabajo de campo sugieren la existencia de sacos vocales en los machos de esta especie. Se trata de una especie de hílido grande, con base en los datos morfométricos hemos determinado que en promedio las hembras miden 74.4 mm de Longitud Hocico Cloaca (LHC) ($n=11$, max: 87.3 mm, min: 64 mm); presentan la siguiente fórmula membranal en las manos: $I2 - 2\frac{1}{2}II1^+ - 2III1\frac{3}{4} - 1^+IV$, mientras que en las patas es la siguiente: $I1\frac{1}{2} - 2II\frac{3}{4} - 1\frac{3}{4}III1^+ - 1\frac{1}{2}IV1\frac{3}{4} - \frac{3}{4}V$ (Figura 9B, C); piel sobre el dorso del cuerpo mayoritariamente lisa con tubérculos poco desarrollados sobre la superficie lateral del cuerpo (Figura 9A); piel sobre la superficie de la cabeza co-ósificada; prepólex fuertemente desarrollado con el extremo distal redondeado y aplanado, dada la falta de observación directa de machos, no ha sido posible confirmar la presencia/ausencia de excrecencias nupciales y proyección humeral; franja de piel a lo largo de la pata y tarso de forma festoneado (Figura 9D), con proyecciones bajas de forma principalmente triangular separadas unas de otras, mayormente visibles de forma ventral, estas proyecciones se hacen menos evidentes a lo largo del margen externo del 5to dedo, a partir de ahí se limita a una delgada franja de piel que se extiende hasta el

disco del 5to dedo; franja de piel sobre el antebrazo y mano cuenta con unas cuantas proyecciones bajas, de forma más o menos triangular y un extremo distal redondeado, separadas unas de otras, las cuales se encuentran desde el codo hasta la mitad del antebrazo; sobre el margen externo de la mano presenta una serie de pequeñas proyecciones continuas de forma oval, que ocupan la zona del metacarpo, principalmente visibles ventralmente. Superficie dorsal del cuerpo normalmente es de color verde moteado (mayormente verde) (Figura 10C), con algunos individuos capaces de sufrir una metacrosis considerable pasando a ser color café rojizo en su totalidad (Figura 10A).

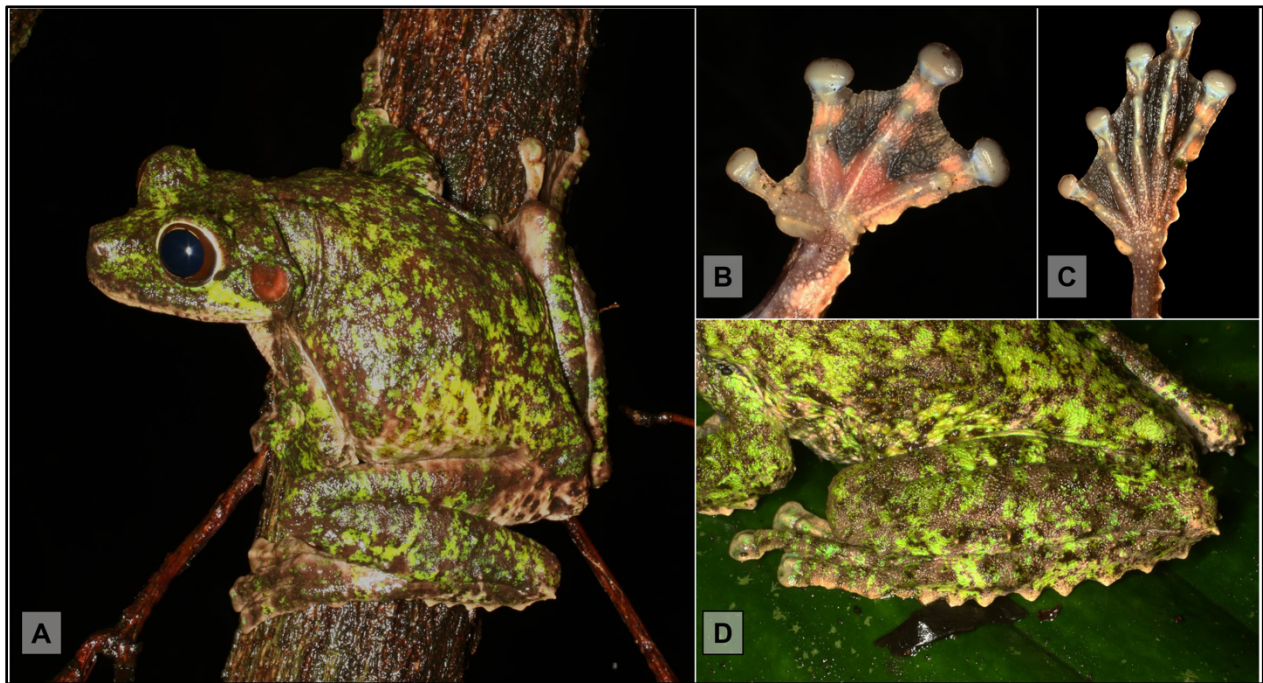


Figura 9. Muestra algunos de los caracteres de una *E. valancifer*. A) Hembra adulta mostrando piel sobre el dorso predominantemente lisa. B) Mano izquierda mostrando el desarrollo de las membranas interdigitales. C) Pata izquierda mostrando el desarrollo de las membranas interdigitales. D) Franja de piel a lo largo de la pata con un aspecto festoneado.



Figura 10. Muestra los diferentes tipos de coloración observados en una *E. valancifer*. A) Espécimen ECO-SCH-4855 con color café rojizo, adoptado después de la metacrosis. B) Color verde olivo uniforme. C) Espécimen ECO-SCH-4856 con color verde moteado (coloración habitual).

Ecnomiohyla sp. nov.

Hembras: 7; Machos: 2

Población La Pera (Figuras 11 y 12)

Hembras= 7; Machos= 1

El único macho examinado mide 62.8 mm de LHC, mientras que las hembras miden en promedio 71.09 mm de LHC ($n=7$, max: 78.2 mm, min: 66.6 mm); fórmula membranar en las manos: $I2^- - 2\frac{1}{2}II1^- - 2^{+}III1\frac{1}{2}2^{+} - 1^{+}IV$, mientras que en las patas es la siguiente: $I1^- - 1\frac{1}{2}II1^- - 1\frac{1}{2}III1^- - 1^{+}IV1^{+} - 1^{+}V$ $I2 - 2\frac{1}{2}II1 - 2III1\frac{3}{4} - 1IV$ (Figura 11B, C); piel sobre la superficie dorsal del cuerpo mayormente rugosa (Figura 10A), mientras que en preservación es más rugosa que lisa, en ambos casos también se caracteriza por ser débilmente tuberculado, con un número variable de tubérculos ligeramente pronunciados sobre la superficie de la cabeza, canthus rostralis y en la base de las órbitas oculares, presencia de una serie de tubérculos ligeramente desarrollados situados de forma homogénea a los costados del cuerpo; piel sobre la superficie de la cabeza co-osisificada; presencia de una proyección humeral en machos, el cual es ancho y distalmente redondeado; prepólex fuertemente proyectado, con extremo distal redondeado y aplanado carente de excrecencias nupciales queratinizadas (Figura 11); franja de piel

sobre la pata y tarso festoneado (Figura 11D), con proyecciones bajas de forma principalmente triangular separadas unas de otras, mayormente visibles de forma ventral, estas proyecciones se hacen menos evidentes a lo largo del margen externo del 5to dedo, a partir de ahí se limita a un pliegue delgado de piel que se extiende hasta el disco del 5to dedo; franja de piel sobre el antebrazo y mano con unas cuantas proyecciones bajas, de forma más o menos triangular y un extremo distal redondeado, separadas unas de otras, las cuales se encuentran desde el codo hasta la mitad del antebrazo, en el margen externo de la mano presenta una serie de pequeñas proyecciones continuas de forma oval, que ocupan la zona del metacarpo, principalmente visibles ventralmente. Coloración en vida mayormente verde con manchas marrón oscuro (Figura 11A y 12C), algunos individuos son capaces de sufrir una metacrosis considerable pasando a ser color café rojizo casi en su totalidad (Figura 12A), a pesar de lo anterior, los individuos observados presentan puntos naranjas distribuidos desde la superficie dorsal de la cabeza hasta las piernas, visibles incluso después de la metacrosis (Figura 11A, D y 12A), todos los individuos observados presentan una mancha oscura en la superficie dorsal de la cabeza (entre las orbitas oculares) en forma de pata con tres dedos (de forma muy evidente), también visible después de la metacrosis (Figura 11A y 12A-C).

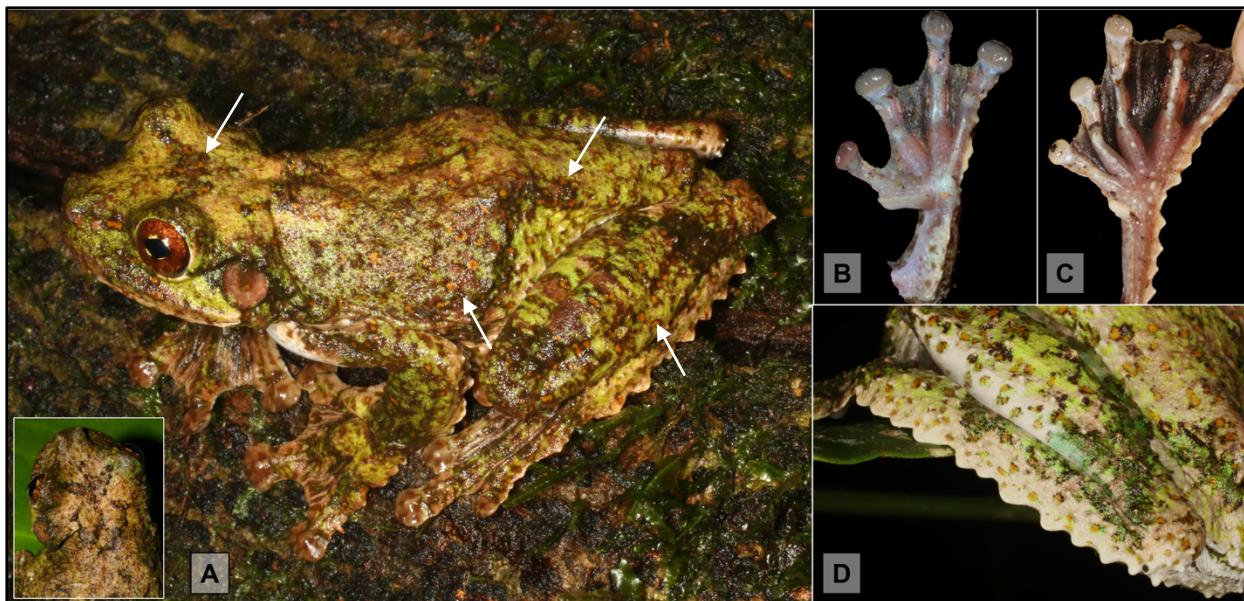


Figura 11. Caracteres de una *Ecnomihyla* sp. nov. A) Hembra adulta (ECO-SCH-4859) mostrando piel sobre el dorso rugosa, nótese la mancha en forma de pata con tres dedos en la superficie de la cabeza, así como los puntos de color naranja (flechas blancas). B) Mano izquierda mostrando el prepólex. C) Pata izquierda mostrando el desarrollo de las membranas interdigitales. D) Franja de piel a lo largo de la pata con un aspecto festoneado, también se visualizan los puntos de color naranja (ECO-SCH-4854).



Figura 12. Muestra los diferentes tipos de coloración observados en una *Ecnomiohyla sp. nov.* A) Color café rojizo, adoptado después de la metacrosis con puntos naranjas visibles (flechas blancas). B) Especimen ECO-SCH-4854 con color verde claro. C) Color verde con manchas marrón oscuro (coloración habitual). En todas las variaciones de color siempre está presente la mancha en forma de pata con tres dedos y los puntos de color naranja.

Población Nahá (Figuras 13 y 14)

Hembras: 0; Machos: 1

Después de revisar y comparar a los especímenes disponibles de diferentes especies, se determinó que el ejemplar MZFC 36211, reportado para la comunidad de Nahá por Barrio-Amorós *et al.*, (2024), no corresponde con las características diagnósticas de *E. minera*. Adicionalmente, se trata de un ejemplar macho y no una hembra, debido a la presencia de una proyección humeral, carácter exclusivo de los machos de este género (Mendelson *et al.*, 2008; Savage y Kubicki, 2010; Batista *et al.*, 2014; Mendelson *et al.*, 2015) (Figura 14C). Por lo señalado anteriormente, en este segmento se aporta la descripción de un solo ejemplar, siendo el mismo referido por Barrio-Amorós *et al.*, (2024), considerado aquí como la misma entidad taxonómica que *Ecnomiohyla sp. nov.*

Macho adulto con las siguientes características: LHC 66.8 mm; fórmula membranar en las manos: $I2 - 2\frac{1}{2}II1 - 2III1\frac{3}{4} - 1IV$, mientras que en las patas es la siguiente: $I\frac{3}{4} - 1\frac{1}{2}II\frac{3}{4} - 1\frac{1}{2}III1 - 1\frac{1}{4}IV1\frac{1}{2} - \frac{3}{4}V$ (Figura 13B, C); piel sobre la superficie dorsal del cuerpo granulado, con abundantes tubérculos diminutos siendo de mayor cantidad en la parte cefálica, entre los tímpanos, y disminuyendo en número hacia la parte posterior del cuerpo (Figura 14A, B), la parte lateral lisa sin presencia de estos tubérculos, también presentan una serie de tubérculos bajos e indistintos (más grandes que los que cubren todo el dorso) distribuidos entre la parte cefálica y el primer tercio del tórax, estos se vuelven más abundantes lateralmente; piel sobre la superficie de la cabeza co-ossificada (Figura 14B); proyección humeral en machos presente, ancho y distalmente redondeado; prepólex fuertemente proyectado, distalmente redondeado, no es bífido, carente de excrecencias nupciales de color negro (Figura 13B y 14C); franja de piel sobre la pata y tarso festoneado, con proyecciones bajas de forma principalmente oval unidas unas a otras por un pliegue de piel, estas proyecciones se hacen más altas a lo largo del margen externo del 5to dedo, ocupando la zona del metatarso; franja de piel sobre el antebrazo y mano con unas cuantas proyecciones bajas, de forma más o menos oval y un extremo distal redondeado, separadas unas de otras.

La coloración en vida es un verde moteado con tonos color café rojizo y marcas oscuras, con puntos naranjas distribuidos desde la superficie dorsal de la cabeza hasta las piernas (Figura 13A, D y 14A), algunos individuos son capaces de sufrir una metacrosis considerable pasando a ser color café rojizo con manchas verde oscuro (Figura 14A), también presenta una mancha oscura en la superficie dorsal de la cabeza (entre las orbitas oculares) en forma de pata con tres dedos (Figura 13D y 14A).



Figura 13. Muestra algunos de los caracteres de una *Ecnomiohyla* sp. nov. (población Nahá), en la figura se muestra al individuo MZFC-36211. A) Macho adulto mostrando su aspecto general y coloración en vida. B) Mano izquierda mostrando el desarrollo de las membranas interdigitales, así como el prepólex. C) Pata izquierda mostrando el desarrollo de las membranas interdigitales. D) Detalle de la parte dorsal de la cabeza, muestra la mancha en forma de pata con tres dedos (elipse) y los puntos naranjas (flechas blancas). Todas las fotografías fueron tomadas de Barrio-Amorós *et al.*, (2024).

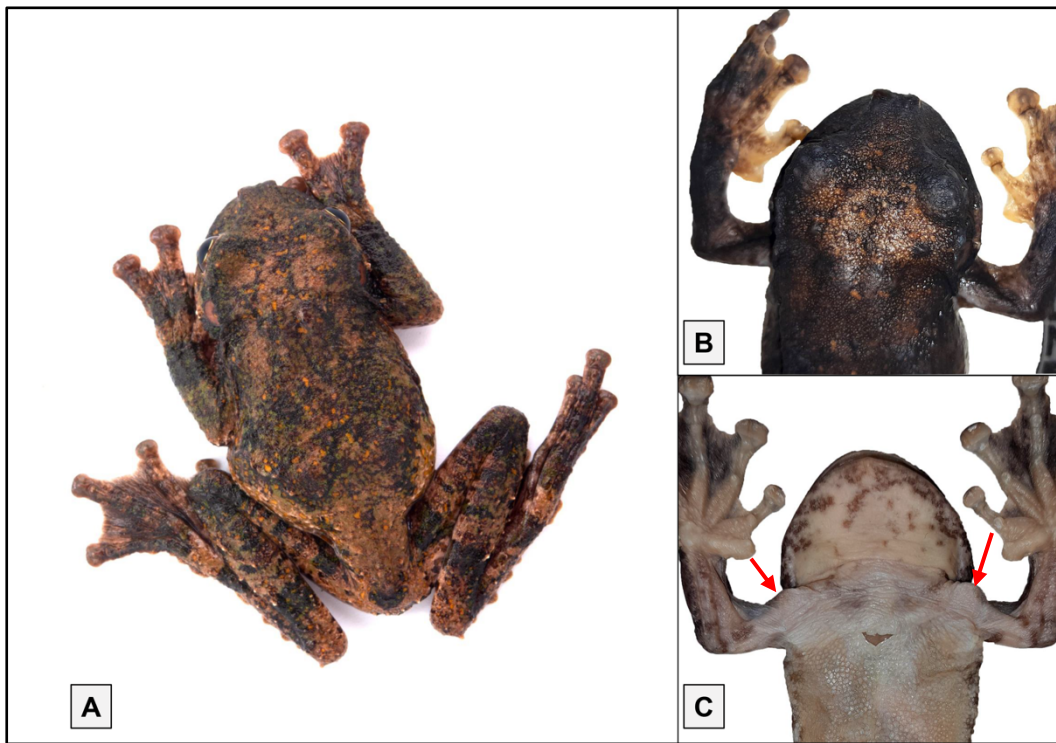


Figura 14. Ejemplar MZFC-36211 A) Muestra el color café rojizo con manchas verde oscuro adoptado después de la metacrosis, puntos naranjas son visibles. B) Muestra co-ossificación craneal y piel granulada. C) Muestra la proyección humeral en ambos brazos (flecha roja). Fotografías: (A) Tomada de Barrio-Amorós *et al.*, (2024).

***Ecnomiohyla minera* (Wilson, McCranie y Williams, 1985)**

(Figuras 15, 16 y 17)

Hembras: 0; Machos: 1

Hyla minera — Wilson, McCranie, and Williams, 1985.

Ecnomiohyla minera — Faivovich, Haddad, Garcia, Frost,
Campbell, and Wheeler, 2005.

La siguiente descripción corresponde a un solo macho adulto (USAC-3475) proveniente de Santa Cruz Barillas, Huehuetenango, Guatemala; el individuo correspondiente al número de catálogo USAC-4433 proviene de Puerto Barrios, Izabal, Guatemala, sin embargo, no fue posible su localización física; no obstante, se adjuntan algunas imágenes como referencia (Figura 17).

Macho de gran tamaño midiendo 72.4 mm de LHC (Figura 15A), fórmula membranal en las manos: $I2 - 2\frac{1}{2}II1 - 2III1\frac{3}{4} - 1IV$ (Figura 14B), mientras que en las patas es la siguiente: $I\frac{3}{4} - 1\frac{1}{2}II\frac{3}{4} - 1\frac{1}{2}III1 - 1\frac{1}{4}IV1\frac{1}{2} - \frac{3}{4}V$; piel sobre la superficie dorsal del cuerpo con múltiples tubérculos grandes y desarrollados, esparcidos en la parte cefálica pero siendo más abundantes sobre el tórax y en los costados del cuerpo, el resto de piel es rugosa (Figura 15A, C); piel sobre la superficie de la cabeza co- osificada; determinamos la presencia de una proyección humeral bastante desarrollada, perceptible a simple vista la cual es ancha y distalmente redondeada (Figura 15D); prepólex fuertemente proyectado, redondeado y no es bífido (Figura 15B, D y 16A), con excrecencias nupciales negras queratinizadas en forma de espinas cónicas con base circular, visto ventralmente estos son escasos, también están presentes en la base del primer dedo de la mano y se extienden hasta la segunda falange (Figura 16A, B); franja de piel sobre la pata y tarso festoneado, con proyecciones altas de forma triangular con extremo distal agudo, bien separadas unas de otras, estas proyecciones se extienden hasta la 2da falange del 5to dedo; franja de piel sobre el antebrazo y mano débilmente desarrollada con unas cuantas proyecciones bajas, de forma triangular con extremo distal redondeado, separadas unas de otras, con antebrazos muy robustos. Coloración en vida verde moteado, con motas café oscuro a grisáceo (Figura 17) con algunos individuos

capaces de sufrir una metacrosis considerable pasando a ser color café claro con marcas color verde oscuro (Figura15A).

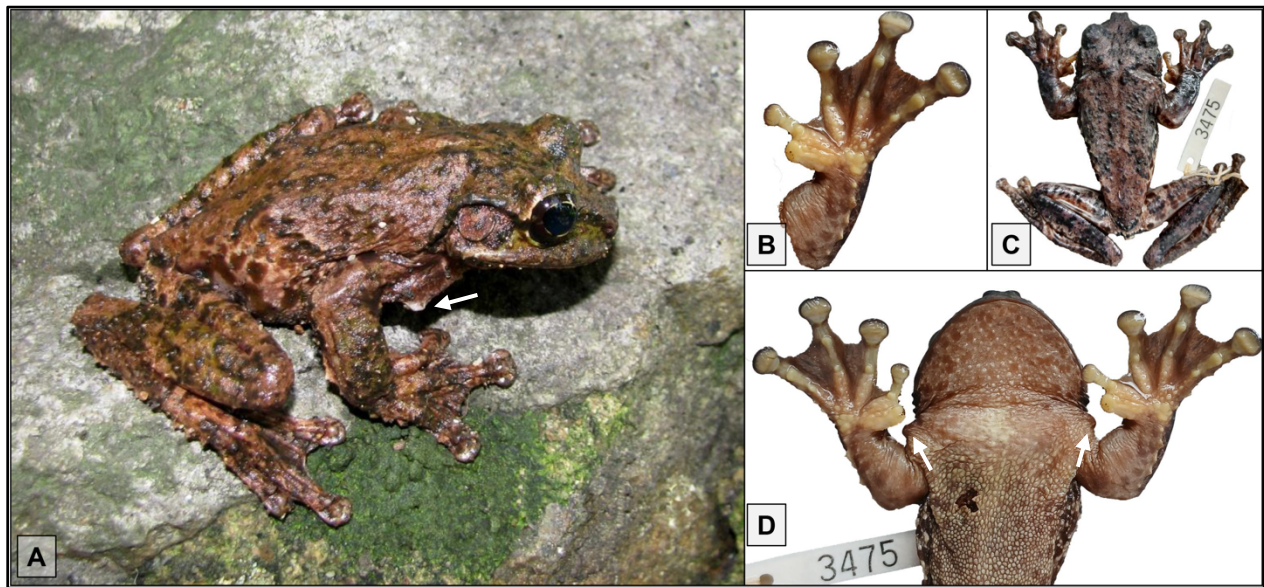


Figura 15. *E. minera*, macho adulto (USAC-3475). A) Aspecto general mostrando detalles sobre la forma y posición de los tubérculos sobre la piel, nótese la proyección humeral indicada por la flecha blanca. B) Mano izquierda mostrando el desarrollo de las membranas interdigitales, así como el prepólex. C) Muestra los múltiples tubérculos sobre la superficie dorsal del cuerpo. D) Vista de la superficie ventral del cuerpo, muestra las proyecciones humerales indicadas por las flechas blancas. Fotografías: (A) Carlos V. Almazán.



Figura 16. A) Vista dorsal de la posición y distribución de las excrecencias nupciales (flechas rojas) en el macho de *E. minera* (USAC-3475). B) Se observa con detalle las características morfológicas de las excrecencias nupciales observadas en el espécimen USAC-3475.



Figura 17. Individuo de *E. minera* (USAC-4433) proveniente de Puerto Barrios, Izabal, Guatemala, probablemente hembra debido a la ausencia de excrescencias nupciales en la base del pulgar. A) Aspecto general mostrando la coloración en vida. B) Vista dorsal de la mano derecha mostrando el desarrollo de las membranas interdigitales. C) Vista dorsal mostrando la coloración sobre la superficie del cuerpo. Todas las fotografías fueron por Andrés Novales.

***Ecnomiohyla salvaje* (Wilson, McCranie and Williams, 1985)**

(Figuras 18 y 19)

Hembras: 1; Machos: 0

Hyla salvaje — Wilson, McCranie, and Williams, 1985.

Ecnomiohyla salvaje — Faivovich, Haddad, Garcia, Frost,
Campbell, and Wheeler, 2005.

Durante el desarrollo de este estudio no fue posible examinar ningún ejemplar macho de esta especie. Los especímenes que estuvieron disponibles para su revisión fueron una hembra adulta (USAC-4434) y un ejemplar en proceso de metamorfosis (USAC-4435), “metamorfo” en etapa 45 según Gosner, (1960); de modo que la descripción que se presenta a continuación se basa en un solo ejemplar adulto hembra (USAC-4434), ya que el metamorfo aún no exhibe los caracteres morfológicos diagnósticos propios de un adulto, no obstante, se incluyen registros fotográficos del ejemplar (Figura 19).

Hembra de gran tamaño (84.2 mm de LHC) (Figura 18A) con fórmula membranal en las manos: $I2^+ - 2\frac{1}{2} - III1^+ - 2^+ - III1\frac{3}{4} - 1IV$, mientras que en las patas es la siguiente: $I1 - 1\frac{1}{2} - II1^+ - 1\frac{1}{2} - III\frac{1}{2} - 1\frac{1}{2} - IV1\frac{1}{2} - \frac{3}{4}V$ (Figura 18B, C); piel sobre la superficie dorsal del cuerpo predominantemente lisa con múltiples tubérculos bajos y redondeados, esparcidos en la parte cefálica, el tórax y en los costados del cuerpo (Figura 18D); piel sobre la superficie de la cabeza co-ossificada aunque poco desarrollado; se observa un prepólex poco desarrollado, no proyectado (Figura 18B); debido a que no se observaron machos, no podemos confirmar la presencia/ausencia de excrescencias nupciales negras queratinizadas y proyección humeral; franja de piel sobre la pata y tarso festoneado, con proyecciones bajas de forma triangular con extremo distal redondeado, separadas unas de otras, estas proyecciones se extienden hasta la 3ra falange del 5to dedo (Figura 18A, C); franja de piel sobre el antebrazo y mano débilmente desarrollada con unas cuantas proyecciones bajas, de forma triangular con extremo distal redondeado, separadas unas de otras. Coloración en vida verde musgo con motas de color verde olivo oscuro, con individuos capaces de sufrir una metacrosis considerable pasando a ser color marrón rojizo oscuro (Figura 18A).

A continuación, se presentan comparaciones diagnósticas de *Ecnomiohyla* sp. nov. con otros miembros del género *Ecnomiohyla* (ver Anexo 2 para más detalle). *Ecnomiohyla* sp. nov. difiere de *E. valancifer*, *E. echinata*, *E. minera* y *E. salvaje* por tener un dorso principalmente rugoso o granulado (mayormente liso en *E. valancifer*, liso en *E. echinata*, predominantemente liso con tubérculos bajos y redondeados en *E. salvaje* y con múltiples tubérculos grandes y desarrollados en *E. minera*), con tubérculos ligeramente desarrollados a los costados del cuerpo (poco desarrollados en *E. valancifer*, liso en *E. echinata*, bajos y redondeados en *E. salvaje*, grandes y desarrollados en *E. minera*), carente de excrecencias nupciales queratinizadas en machos (presente en *E. minera* y *E. salvaje*), dorso mayormente de color verde con motas color marrón rojizo y puntos naranjas en cantidad moderada pero perceptibles por toda la superficie dorsal del cuerpo, brazos y piernas (puntos naranjas escasos o ausentes en *E. valancifer*, *E. echinata*, *E. salvaje* y *E. minera*), presencia de una mancha en forma de pata con tres dedos en la cabeza (ausente en *E. valancifer*, *E. echinata*, *E. salvaje* y *E. minera*). *Ecnomiohyla* sp. nov. difiere de *E. bailarina* de Costa Rica y Panamá por carecer de osteodermos dorsales y craneales (presentes en *E. bailarina*), de *E. fimbrimembra* de Costa Rica y Panamá por presentar un pliegue de piel festoneado sobre la pata y tarso (ausente en *E. fimbrimembra*), de *E. miliaria* de Honduras a Panamá y *E. phantasmagoria* de Colombia y Ecuador por presentar un prepólex plano y redondeado (grande y recurvado en *E. miliaria* y *E. phantasmagoria*), de *E. rabborum* de Panamá por tener la piel sobre la superficie de la cabeza co-osificada (no co-osificada en *E. rabborum*), de *E. sukia* de Costa Rica por poseer proyección humeral en machos (ausente en *E. sukia*), de *E. thysanota* de Panamá por tener un dorso rugoso o granulado (liso en *E. thysanota*) y de *E. veraguensis* por carecer de excrecencias nupciales queratinizadas (unas pocas con forma de espinas en *E. veraguensis*).



Figura 18. Hembra adulta de *E. salvaje* (USAC-4434). A) Aspecto general mostrando la coloración en vida adoptado después de la metacrosis, también nótese el pliegue de piel festoneado (flecha blanca). B) Mano derecha mostrando el desarrollo de las membranas interdigitales, así como el prepólex. C) Pata derecha mostrando el desarrollo de las membranas interdigitales, así como parte del pliegue de piel festoneado. D) Vista de la superficie dorsal del cuerpo mostrando la distribución de los múltiples tubérculos bajos y redondeados. Fotografías: (A) Carlos V. Almazán.



Figura 19. Ejemplar de *E. salvaje* en la fase de "Metamorpho" y etapa 45 de desarrollo de acuerdo a Gosner, (1960) (USAC-4435). A) Aspecto general mostrando la coloración en vida. B) Vista dorsal del ejemplar en preservación. C) Vista ventral del ejemplar en preservación. Fotografías: (A) Carlos V. Almazán.

VIII.- DISCUSIÓN

Los análisis filogenéticos permitieron inferir relaciones bien soportadas entre la mayoría de las especies del género *Ecnomiohyla* y en su mayoría fue congruente con los trabajos publicados previamente sobre el género (Batista *et al.*, 2014; Duellman *et al.*, 2016; Faivovich *et al.*, 2018). La congruencia entre las topologías obtenidas mediante inferencia bayesiana (BI) y máxima verosimilitud (MV) respalda la robustez de los resultados, especialmente en clados terminales con alto soporte estadístico (Figuras 7 y 8), reflejado en los valores de probabilidad posterior (BI) y bootstrap no paramétrico (MV). En este estudio se logró incluir a nueve de las doce especies descritas del género, y se propone una nueva especie endémica del norte de Chiapas, *Ecnomiohyla sp. nov.* A partir de estos resultados, el número de especies reconocidas en *Ecnomiohyla* se eleva a 13. Además, se reporta por primera vez la posición filogenética de *E. valancifer*, *E. salvaje* y *Ecnomiohyla sp. nov.*

Hasta ahora, este constituye el estudio filogenético más completo del género *Ecnomiohyla* basado en un gen mitocondrial. Aunque algunas especies del género ya habían sido incluidas en análisis filogenéticos de gran escala en estudios previos (Faivovich *et al.*, 2005; Wiens *et al.*, 2010; Pyron y Wiens, 2011; Batista *et al.*, 2014; Duellman *et al.*, 2016; Faivovich *et al.*, 2018), dichos trabajos presentan limitaciones importantes, especialmente en cuanto número de taxones analizados y su enfoque geográfico restringido a las especies del sur de Centroamérica. En este estudio, analizamos secuencias de ADN de 10 de las 13 especies de *Ecnomiohyla* conocidas en todo su rango de distribución. Cabe mencionar que las secuencias de seis de estas especies provienen del trabajo de Batista *et al.*, (2014), lo cual contribuyó al fortalecimiento de este estudio. Además, se incluyó como grupo externo a *Rheohyla miotympanum*, taxón que ha sido consistentemente reconocido como el grupo hermano de *Ecnomiohyla* (Batista *et al.*, 2014; Duellman *et al.*, 2016; Faivovich *et al.*, 2018).

Por otro lado, también se han cubierto aspectos geográficos importantes, por ejemplo, se sabe que las especies de *Ecnomiohyla* presentes en Centroamérica Nuclear (CAN) se distribuyen de forma discontinua: en la región de Los Tuxtlas (*E. valancifer*), en la pendiente del atlántico de la Sierra Juárez de Oaxaca (*E. echinata*), ambas en México; luego había un salto hacia la Sierra de las Minas y la Sierra de los Cuchumatanes en Guatemala (*E. minera*) y finalmente en la Sierra de Omoa y el Parque Nacional Cusuco en Honduras (*E. salvaje*) (Mendelson *et al.*, 2015; Thorp *et al.*, 2021). Sin embargo, con el descubrimiento de *Ecnomiohyla* sp. nov., el vacío de distribución que existía en el estado de Chiapas ha sido cubierto (Figura 20). Este hallazgo refuerza la posición de Chiapas como una zona de transición fundamental para la herpetofauna y se sugiere que la diversidad del género *Ecnomiohyla* es mayor de la que se había asumido previamente.

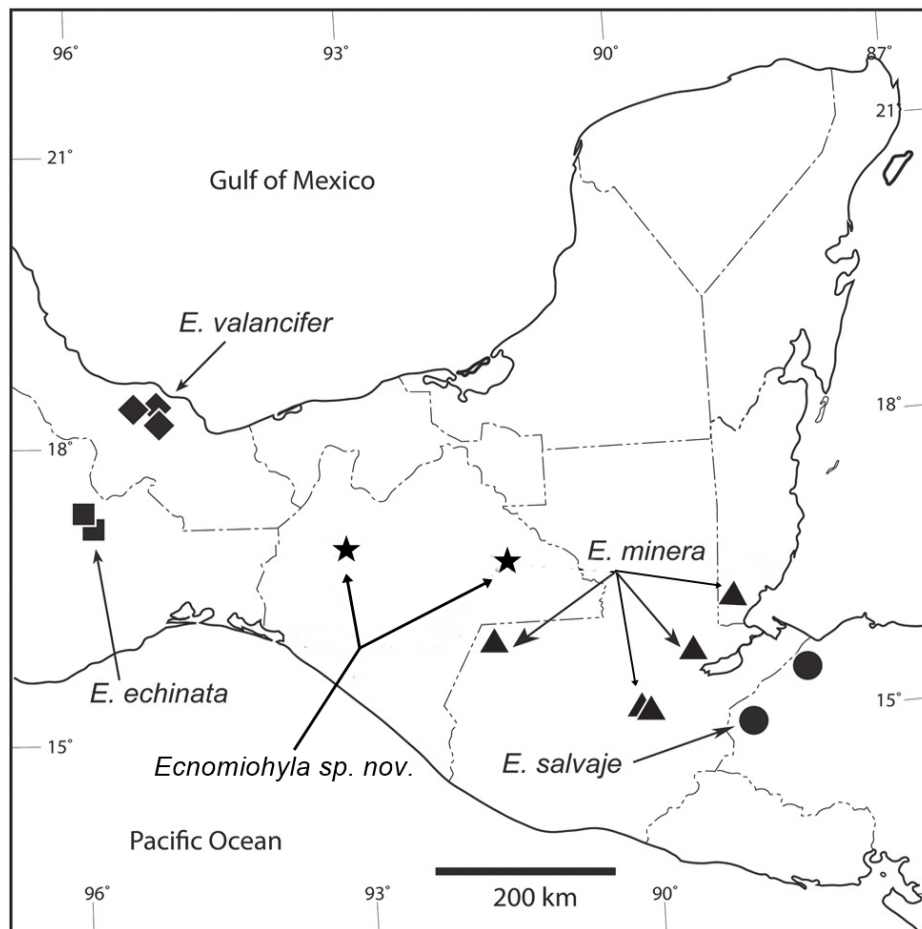


Figura 20. Distribución geográfica actual de las especies de *Ecnomiohyla* presentes en el núcleo centroamericano. Mapa modificado de Mendelson *et al.*, (2015).

8.1 Relaciones filogenéticas y patrones biogeográficos

La estructura filogenética general revela la existencia de dos clados principales (Clado A y Clado B) (Figura 7). El clado B, que agrupa a *E. fimbrimembra*, *E. bailarina* y *E. rabborum*, presenta una afinidad evolutiva bien definida, que corresponde con su distribución geográfica en la región de Costa Rica y Panamá. Por su parte, el clado A es más complejo e incluye a las especies distribuidas en la CAN, dentro de este clado se agrupa a *E. miliaria*, *E. salvaje*, *E. minera*, *E. valancifer*, *E. veraguensis*, *E. sukia* y *Ecnomiohyla sp. nov.* La relación de especies hermanas entre *E. salvaje* (Guatemala-Honduras) y *E. minera* (Guatemala), junto con su afinidad con *E. miliaria* (Honduras a Panamá), sugiere un patrón de diversificación asociado a la continuidad geográfica de sus distribuciones.

Sin embargo, uno de los hallazgos más relevantes y con mayores implicaciones biogeográficas fue la estrecha relación entre *Ecnomiohyla sp. nov.* (Chiapas) y *E. valancifer* (Veracruz), contradiciendo la hipótesis inicial de que la población chiapaneca estaría más relacionada con especies centroamericanas. Esta relación es consistente y fuertemente soportada en ambos análisis: tanto en el árbol de inferencia bayesiana, con una probabilidad posterior del 100% (Figura 7), como en el árbol de máxima verosimilitud, con un soporte bootstrap igualmente del 100% (Figura 8). Aunque este resultado se basa en un solo marcador mitocondrial (16S), su máximo soporte en dos metodologías distintas, junto con la congruencia morfológica (Sección 8.3), confiere robustez a esta relación. Las implicaciones del uso de un único marcador se discuten con detalle en la Sección 8.4.

Este resultado no es único; un patrón de disyunción similar fue documentado por Escobedo (2021) en el género *Quiltichohyla*, donde la especie de Chiapas y específicamente de la misma localidad tipo que *Ecnomiohyla sp. nov.*, tampoco mostró una afinidad evolutiva más cercana con sus congéneres más cercanos, sino con una especie geográficamente más distante. Este patrón ya se ha repetido en otros grupos de especies, por ejemplo, en la víbora de palma *Bothriechis guifarroi*, la salamandra *Nototriton tomamorum* y la rana *Istmohyla insolita* (Townsend *et al.*, 2013; Townsend *et al.*, 2010; Köhler, 2011).

El resultado que agrupa estrechamente a *Ecnomiohyla sp. nov.* (Chiapas) con *E. valancifer* (Veracruz), en lugar de con *E. minera* (localizada más al sur), contrasta con el patrón biogeográfico comúnmente documentado en la herpetofauna de Chiapas y Centroamérica, en donde la herpetofauna chiapaneca presenta una mayor afinidad con la de Centroamérica que con la del resto de México (Johnson *et al.*, 2015; Muñoz, 2010). Este patrón pone de manifiesto dos cosas. La primera es que las relaciones evolutivas de un linaje no siempre se explican únicamente por la proximidad geográfica actual, sino que también pueden ser el resultado de procesos históricos más complejos. La segunda permite plantear la hipótesis de que la región ha sido moldeada por eventos biogeográficos compartidos, lo cual coincide con propuestas que destacan la necesidad de considerar la historia geológica y los procesos tectónicos antiguos en la estructuración biogeográfica de Centroamérica Nuclear para explicar la distribución actual de estas especies (Gutiérrez-García y Vázquez-Domínguez, 2013).

La presencia histórica de *E. echinata* en la Sierra Juárez de Oaxaca, entre las distribuciones actuales de *E. valancifer* y *Ecnomiohyla sp. nov.* (Mendelson *et al.*, 2015), aporta un elemento clave para interpretar los patrones de distribución observados. Aunque no fue posible obtener material genético de *E. echinata* por su extrema rareza e incluso posible extinción local (IUCN, 2025), su existencia documentada permite plantear varios escenarios biogeográficos. Entre ellos destacan la vicarianza, asociada a procesos geológicos como el levantamiento de la Sierra Madre de Oaxaca y la formación del Istmo de Tehuantepec (Mulcahy *et al.*, 2006; Rovito *et al.*, 2012; Duellman *et al.*, 2016), así como la persistencia en refugios climáticos, propuesta en diversos estudios para explicar distribuciones disyuntas en anfibios y reptiles mesoamericanos (Townsend *et al.*, 2010; Köhler, 2011; Townsend *et al.*, 2013). Dichos escenarios son consistentes con propuestas que explican la distribución actual de la biota mesoamericana como resultado de una interacción prolongada entre eventos tectónicos y climáticos durante el Cenozoico (Gutiérrez-García y Vázquez-Domínguez, 2013). En este sentido, la expansión y contracción de hábitats montanos y mesófilos, junto con episodios de aislamiento y reconexión, podrían haber moldeado la historia evolutiva de estas especies de *Ecnomiohyla*.

No obstante, la resolución limitada del marcador mitocondrial 16S restringe la posibilidad de inferir con precisión los tiempos y procesos de divergencia, lo que se discute más adelante. Esta limitación se debe al diseño metodológico del estudio, orientado a mantener la comparabilidad con los datos generados por Batista *et al.*, (2014), cuyo estudio es base de referencia para el género.

8.1.1 Posición filogenética y delimitación específica de *Ecnomiohyla miliaria*

La politomía en la base del clado A (Figura 7) no se muestra en estudios previos como Batista *et al.*, (2014), Duellman *et al.*, (2016) y Faivovich *et al.*, (2018). Generalmente las politomías se presentan por falta de datos o poco poder de resolución (politomías blandas) (Farrera, 2014) y ocurre cuando no se puede resolver el orden exacto de divergencia entre tres o más linajes. En el caso del clado A (Figura 7) los tres grupos que forman esa politomía tienen fuerte soporte internamente, lo que significa que los linajes dentro de cada clado están bien definidos, por ejemplo, *E. valancifer* y *Ecnomiohyla sp. nov.*, realmente forman un grupo, pero las relaciones entre estos tres grupos (*E. miliaria*, *E. salvaje* + *E. minera*, *E. valancifer* + *Ecnomiohyla sp. nov.*) no pueden resolverse con confianza (Maddison, 1989; Whitfield y Lockhart, 2007). Lo anterior puede deberse en este caso a que el gen mitocondrial 16s, puede no tener suficiente resolución para resolver relaciones entre especies que divergieron hace poco o muy rápido (Farrera, 2014). No obstante, la selección de este marcador se basó en su utilidad comprobada dentro del género (Batista *et al.*, 2014) y en la necesidad de homologar los datos con las secuencias previamente publicadas.

Un aspecto particularmente relevante es la posición de *E. miliaria*, la cual se encuentra ubicada dentro de una politomía bien soportada, junto con dos clados definidos. Aunque tiene una distribución amplia desde Honduras hasta Colombia, en este estudio aparece filogenéticamente cercana a especies de distribución más septentrional, como *E. salvaje* y *E. minera*, en lugar de agruparse con otras especies del sur de su rango. Esto resulta llamativo, dado que las secuencias de *E. miliaria* utilizadas en este estudio provienen de ejemplares colectados en Panamá (Batista *et al.*, 2014). Este arreglo filogenético difiere de lo reportado por Faivovich *et al.*, (2018) y Batista *et al.*, (2014), en parte porque estos estudios no incluyeron especies como *E. valancifer*, *E.*

salvaje y *Ecnomiohyla* sp. nov. (esta última descrita en este estudio) lo que pudo haber limitado la resolución de sus análisis.

Por otro lado, nuestros resultados coinciden parcialmente con los de Duellman *et al.*, (2016), quienes reportaron a *E. minera* y *E. miliaria* como especies hermanas con un fuerte soporte del bootstrap no paramétrico. En contraste, nuestros análisis recuperan a *E. minera* (Guatemala) y *E. salvaje* (Honduras) como especies hermanas, mientras que *E. miliaria* aparece como el linaje más cercano a ellas. Sin embargo, el estudio de Duellman *et al.*, (2016) incluyó únicamente a tres taxones (*E. minera*, *E. miliaria*, y *E. rabborum*), por lo que su filogenia no aporta información sobre la posición del resto de los miembros del género. La posición filogenética de *E. miliaria* contrasta con lo esperado desde una perspectiva biogeográfica, dado que esta especie posee la distribución más amplia del género, extendiéndose desde el sureste de Honduras hasta el noroeste de Colombia (McCranie *et al.*, 2003; Köhler, 2011; Batista *et al.*, 2014; Valencia-Zuleta *et al.*, 2016). Dado que las secuencias empleadas en este estudio provienen de un ejemplar de Panamá (Cuadro 1), sería razonable esperar una mayor afinidad con otras especies panameñas como *E. rabborum*, *E. veraguensis* o *E. fimbrimembra*, que comparten una distribución geográfica similar.

Una posible explicación para esta configuración es que estos linajes hayan experimentado una radiación evolutiva rápida, en la que divergieron casi simultáneamente de un ancestro común en un corto lapso evolutivo. Este patrón ha sido documentado en otros grupos de anfibios en zonas de alta heterogeneidad topográfica, como es el caso de las tierras altas mesoamericanas (Wiens *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2009). No obstante, para confirmar esta hipótesis sería necesario incorporar un enfoque multilocus que permita resolver con mayor precisión los tiempos y patrones de divergencia, ya que el uso de un solo marcador mitocondrial (16s) no es suficiente para discriminar entre eventos de especiación recientes o complejos (Vences *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2016).

En consecuencia, la posición de *E. miliaria* podría reflejar tanto una afinidad filogenética real con los linajes del norte de Mesoamérica, como limitaciones metodológicas derivadas del uso de un solo marcador molecular. Para esclarecer estas relaciones sería necesario ampliar el muestreo geográfico, particularmente de poblaciones de *E. miliaria* de Honduras, Nicaragua y Costa Rica (Fouquet *et al.*, 2007), así como incorporar genes nucleares y mitocondriales adicionales, especialmente considerando que entre Nicaragua y Costa Rica existe una barrera geológica, la Depresión de Nicaragua (Mendoza *et al.*, 2019), la cual podría estar influyendo en las relaciones de este grupo de especies.

Por otra parte, la amplia distribución de *E. miliaria* contrasta con el patrón general del género, caracterizado por distribuciones muy restringidas, en algunos casos siendo endémicas o microendémicas, cómo es el caso de *E. valancifer*, *E. echinata*, *Ecnomihyla* *sp. nov.* Esto sugiere que *E. miliaria*, tal como está definido actualmente, podría constituir un complejo de especies crípticas aún no descritas (Batista *et al.*, 2014).

Una evidencia que respalda esta idea es la existencia de al menos dos especímenes asignados a *E. miliaria* en Panamá, uno proveniente de la Reserva Forestal Fortuna (Myers y Duellman, 1982) y otro de El Copé, los cuales presentan diferencias morfológicas con respecto a *E. miliaria* de Honduras, *E. sukia* o *E. veraguensis*, particularmente en la textura de la piel y en la forma del pliegue de piel festoneado (Myers y Duellman, 1982; Savage y Kubicki, 2010; Batista *et al.*, 2014), lo que sugiere una posible subestructura taxonómica dentro de lo que actualmente se considera una sola especie. Estos resultados subrayan la necesidad de revisar la delimitación específica de *E. miliaria* mediante un enfoque integrativo que combine evidencia morfológica, molecular y geográfica tratando de integrar ejemplares de todo su rango de distribución.

8.1.2 Posibles escenarios biogeográficos: vicarianza y refugios climáticos

A continuación, se exploran algunas hipótesis biogeográficas que podrían ayudar a interpretar la relación filogenética cercana entre *E. valancifer* y *E. sp. nov.*, estas interpretaciones se plantean como posibles escenarios, derivados del análisis comparativo entre los datos obtenidos de este estudio y patrones conocidos para otros grupos de anfibios y reptiles mesoamericanos. No obstante, es importante advertir que el presente trabajo no incluyó un análisis de reloj molecular, tiempos de divergencia, ni modelado ecológico, por lo que las explicaciones históricas aquí discutidas deben considerarse inferencias preliminares. Si bien se reconoce la relevancia de estos enfoques para dilucidar la historia evolutiva del grupo, la omisión respondió a una delimitación estratégica del alcance del proyecto. El objetivo primordial de este estudio fue la delimitación de especies con base en la inferencia filogenética, lo cual implicó un esfuerzo significativo y prolongado en la obtención de material biológico representativo de estas especies de difícil observación y distribución discontinua (incluyendo gestiones en colecciones nacionales e internacionales), así como en el ajuste de protocolos moleculares para el procesamiento de dichas muestras. Por lo tanto, se optó por centrar los recursos en asegurar la robustez del análisis filogenético central, dejando los análisis de modelado y datación para futuras líneas de investigación (ver Sección 8.4).

La cercanía filogenética entre *Ecnomiohyla sp. nov.* y *E. valancifer*, observada de manera consistente en los análisis de inferencia bayesiana y de máxima verosimilitud (Figuras 7 y 8), si bien representa un resultado inesperado con base en la hipótesis planteada, coincide con patrones previamente documentados en otros grupos de anfibios, como salamandras del grupo *Bolitoglossa rufescens* (Rovito *et al.*, 2012) y sapos de tierras bajas (Mulcahy *et al.*, 2006), donde se ha evidenciado una relación filogenética cercana entre taxas separados por el istmo de Tehuantepec. No obstante, aunque *E. valancifer* y *E. sp. nov.* habitan en regiones distintas, separadas por más de 250 km de distancia lineal y múltiples unidades fisiográficas, ambas ocupan un hábitat muy similar: selvas húmedas entre los 1 000 y 1 250 msnm. Esto sugiere que la historia biogeográfica de la región ha sido más dinámica de lo que refleja la configuración geográfica actual, y que los procesos históricos que moldearon la distribución de *Ecnomiohyla* pudieron

involucrar eventos de dispersión o vicarianza previos a la consolidación del istmo como barrera tal como sugieren Rovito *et al.*, (2012) y Mulcahy *et al.*, (2006).

En este contexto, se plantean al menos dos hipótesis biogeográficas que podrían explicar este patrón de cercanía: la vicarianza por cambios tectónicos y la persistencia en refugios climáticos. Bajo la primera hipótesis, *E. valancifer* y *E. sp. nov.* podrían ser remanentes de un linaje ancestral con una distribución más continua, posteriormente fragmentada por procesos geológicos o climáticos, como el levantamiento la Sierra Madre de Oaxaca, ocurrido hace 25 a 30 millones de años en el Oligoceno (Hernández-Santana *et al.*, 1995), la formación de las Montañas del Norte en Chiapas, entre el Eoceno y Mioceno (30-5 millones de años) (Müllerried, 1957; Witt *et al.*, 2012), y el surgimiento de la Sierra de Los Tuxtlas, hace aproximadamente 7 a 8 millones de años, durante el Mioceno tardío (Verma *et al.*, 2020).

Aunque todavía no existen datos moleculares de *E. echinata* y su estatus taxonómico es realmente incierto (Mendelson *et al.*, 2015; IUCN, 2025), su histórica presencia en la Sierra Juárez de Oaxaca, ubicada entre las distribuciones actuales de *E. valancifer* y *E. sp. nov.*, apoya la hipótesis de un linaje ancestral común, muy probablemente proveniente de Centroamérica y que tuvo una distribución continua a lo largo de la vertiente del Atlántico del sur de México. Posteriormente, los patrones biogeográficos observados sugieren que la historia evolutiva de estos linajes es el resultado de eventos geológicos y cambios climáticos que han moldeado la distribución de la herpetofauna de la región (Ceballos *et al.*, 2010; Halffter y Morrone, 2017). La configuración de su distribución actual sería un reflejo de procesos históricos, como los cambios climáticos del Pleistoceno que han generado escenarios de expansión y contracción de hábitats montanos, así como periodos de aislamiento y reconexión que explican los patrones de distribución observados en la herpetofauna de México (Lozano-García *et al.*, 2013).

Este modelo vicariante está respaldado por estudios en otros grupos de anfibios donde también han hecho uso de datos moleculares y morfológicos, como la salamandra *Bolitoglossa rufescens* y los géneros *Sarcohyla* y *Plectrohyla*, donde el Istmo de Tehuantepec y cadenas montañosas como la Sierra Madre de Oaxaca y Chiapas han sido identificados como barreras clave que promueven la diversificación faunística (Rovito *et al.*, 2012; Duellman *et al.*, 2016). Cómo ya se mencionó, una barrera geográfica clave en este contexto es el Istmo de Tehuantepec, ampliamente reconocido por su papel en la estructuración biogeográfica de múltiples linajes. Estudios como los de Mulcahy *et al.*, (2006) con sapos, Rovito *et al.*, (2012) con salamandras, Duellman *et al.*, (2016), Caviedes-Solis y Nieto-Montes de Oca (2018) y Mendoza *et al.*, (2019) con ranas arborícolas, han documentado cómo esta región ha limitado el flujo génico entre poblaciones, reforzando procesos de aislamiento.

La segunda hipótesis propone que *E. sp. nov.* y *E. valancifer* son los últimos remanentes de un linaje relicto, es decir, un linaje más antiguo cuya distribución ancestral fue más amplia en el sur de México pero que han persistido en áreas geográficas restringidas que funcionaron como refugios climáticos durante el Pleistoceno (Grandcolas *et al.*, 2014). En este contexto, tanto la Sierra de Los Tuxtlas como las montañas del norte de Chiapas (Nahá y La Pera), pudieron actuar como tales refugios, al conservar condiciones ambientales estables durante los ciclos de cambio climático del Pleistoceno (principalmente glaciaciones). Esto habría permitido la persistencia y divergencia de linajes ancestrales de *Ecnomiohyla* que se extinguieron en otras áreas. Esta hipótesis coincide con patrones previamente documentados en otros grupos de anfibios y reptiles mesoamericanos, como se describe a continuación.

Townsend *et al.*, (2013) describió a la víbora de palma *Bothriechis guifarroi* como un “linaje relicto del norte”. Esta especie se distribuye en el norte de Honduras, y su pariente más cercano es *B. lateralis*, que se distribuye en Costa Rica y el oeste de Panamá. Estas dos especies hermanas están separadas por una importante barrera biogeográfica: la Depresión Nicaragüense. El estudio de Townsend y colaboradores propone que el Refugio de Vida Silvestre Texíguat (localidad tipo de *B. guifarroi*), ha funcionado como un paleo-refugio. Esta región habría mantenido condiciones ambientes

estables a lo largo del tiempo, permitiendo que linajes ancestrales como el de *B. guifarroi* persistan allí. Su aislamiento filogenético con respecto a los taxones de su propia región respalda la hipótesis de que *B. guifarroi* es un remanente de una conexión o distribución pasada. De manera análoga, la disyunción entre *E. sp. nov.* y *E. valancifer* podría reflejar una fragmentación de un linaje ancestral que, en respuesta a eventos de vicarianza geológica (como la formación del Istmo de Tehuantepec) o climática, quedó aislado en refugios. En la misma región de Texíguat, otro ejemplo de linaje relictos es la salamandra *Nototriton tomamorum* y la rana *Istmohyla insolita*, se ha documentado que estas especies están más estrechamente relacionadas con especies de Costa Rica y Panamá que con taxones geográficamente más cercanos (Townsend *et al.*, 2010; Köhler, 2011).

En Mesoamérica, se han propuesto la existencia de varios refugios para las zonas de vegetación tropical húmeda, Toledo (1976) propuso la existencia de cinco y luego ocho refugios (Toledo, 1982), entre los cuales se incluyen Los Tuxtlas, Sierra Juárez y la región Lacandona. Por su parte, Wendt (1987) propuso que la zona de El Arco, que abarca el sureste de Veracruz, el sur de Tabasco y el occidente de Chiapas, ha constituido un refugio desde el Mioceno, esta última región abarcaría la zona de La Pera (Figura 21). Esta idea coincide parcialmente con la propuesta de Brown (1982), quien planteó la existencia de un refugio selvático guatemalteco desde el norte de Oaxaca, la zona del arco y occidente de la Selva Lacandona, Chiapas, hasta el Norte de Honduras.

La hipótesis de un linaje relictos no solo es consistente con los patrones de distribución actuales y la ecología de estas especies, sino que se ve reforzada por ejemplos similares en otros grupos de anfibios y reptiles mesoamericanos. Alternativamente, debe resaltarse que este patrón de disyunción observado podría deberse, al menos en parte, a la baja detectabilidad de estas especies, métodos inadecuados de muestreo, el escaso esfuerzo de muestreo en áreas intermedias, o incluso a extinciones recientes no documentadas. Por lo tanto, si bien los árboles filogenéticos sugieren una relación evolutiva estrecha entre *E. valancifer* y *E. sp. nov.*, aún se requiere evidencia más robusta, como datos de marcadores nucleares, análisis temporales y evaluaciones ecológicas más detalladas, para esclarecer los procesos históricos detrás de dicha relación.

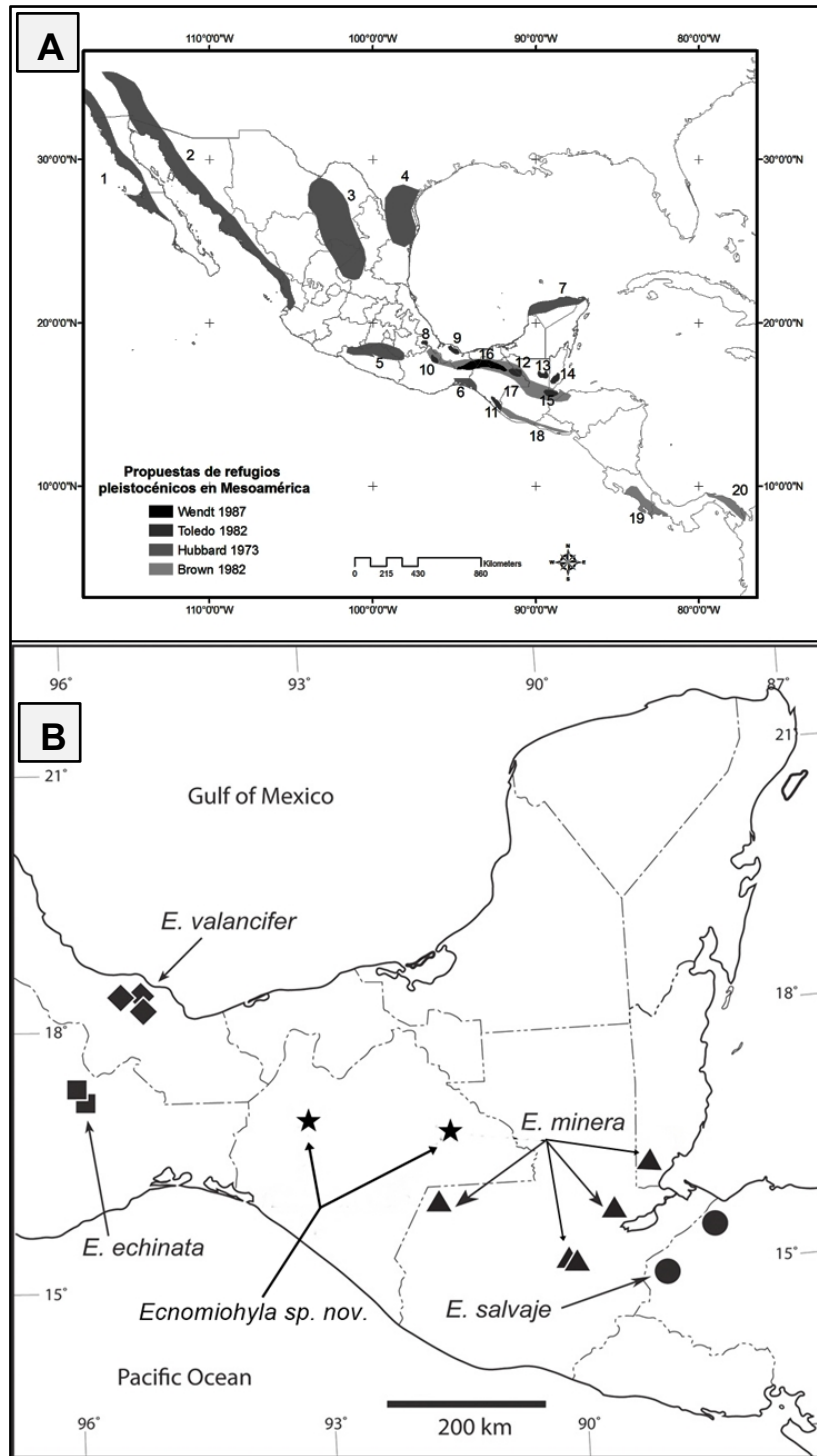


Figura 21. Comparación de los refugios pleistocénicos propuestos en Mesoamérica con la distribución actual de las especies de *Ecnomiohyla*. A) Hubbard (1973): 1. Californiano, 2. Sonorense, 3. Chihuahuense, 4. Del Golfo, 5. del Balsas, 6. De Tehuantepec, 7. De Yucatán. Toledo (1982): 8. Córdoba, 9. Los Tuxtlas, 10. Sierra de Juárez, 11. Soconusco, 12. Lacandona, 13. Petén, 14. Montañas Mayas, 15. Izabal. Wendt (1987): 16. El Arco. Brown (1982): 17. Guatemala (desde Oaxaca hasta Honduras), 18. Pacífico (desde el Soconusco hasta El Salvador), 19. Chiriqui-Azuero, 20. Tacarcuna/Nechí; Tomado de Ríos (2014). B) Distribución geográfica actual de las especies de *Ecnomiohyla* presentes en el núcleo centroamericano. Mapa modificado de Mendelson *et al.*, (2015).

8.2 Historia evolutiva de las poblaciones chiapanecas

Los resultados señalan que las poblaciones de Nahá y La Pera forman un clado monofilético, claramente separado de las demás especies del género, esto nos indica que constituyen una nueva entidad evolutiva dentro de *Ecnomiohyla*, aunado a que las distancias genéticas observadas de 3.3% y 3.7% entre *E. sp nov.* y *E. valancifer*, superan el umbral del 3% comúnmente utilizado para identificar especies candidatas en anfibios tropicales mediante el gen 16S (Vences *et al.*, 2005; Fouquet *et al.*, 2007; Jansen *et al.*, 2011; Crawford *et al.*, 2010, 2013), respaldando la diferenciación a nivel de especie para estas poblaciones.

La relación entre las poblaciones de Nahá y La Pera también ofrece pistas sobre su historia evolutiva. Al pertenecer a la misma entidad biológica, los miembros de ambas poblaciones son morfológica y genéticamente muy similares, con distancias genéticas sutiles (0.4-0.8%), sin embargo, la presencia de *Ecnomiohyla sp. nov.* en dos localidades geográficamente separadas por más de 150 km representa un patrón de distribución aparentemente disyunto. Dado que ambas localidades han sido propuestas como refugios climáticamente estables durante el Pleistoceno (Toledo, 1976, 1982; Wendt, 1987), y que comparten al menos una decena de especies de anfibios (Ochoa-Ochoa and Whittaker, 2014; García, 2015; Real, 2020; Melgar-Martínez *et al.*, 2023) es preciso analizar las posibles causas detrás de esta distribución al parecer fragmentada. En este sentido, podemos plantear tres hipótesis principales a las que se les atribuirían este patrón: A) La persistencia de *Ecnomiohyla sp. nov.* mediante una conexión a través de un refugio común o una red histórica de refugios cercanos o interconectados durante los periodos glaciales, B) Una expansión postglacial desde un único refugio ancestral, posiblemente ubicado en el sur, C) Las poblaciones de *Ecnomiohyla sp. nov.*, y otras especies que comparten este patrón, tuvieron una distribución continua hasta épocas recientes.

En la siguiente sección se discuten los tres escenarios biogeográficos mencionados anteriormente, los cuales buscan explicar la distribución disyunta de las poblaciones chiapanecas. Estas interpretaciones, se plantean como hipótesis derivadas del análisis comparativo entre los patrones de distribución observados y los resultados filogenéticos obtenidos. La discusión de estos escenarios tiene como objetivo principal abrir nuevas líneas de investigación que permitan validar o refutar estas hipótesis en el futuro.

8.2.1 Persistencia en una red de refugios

La primera hipótesis plantea que ambas poblaciones habrían formado parte de un mismo refugio pleistocénico o de una red de refugios interconectados durante los periodos glaciales. Durante estos ciclos de cambio climático, el hábitat de bosque húmedo de las tierras altas se contrajo y fragmentó (Lozano-García *et al.*, 2013; Metcalfe *et al.*, 2000), dejando a las poblaciones aisladas en refugios climáticos que mantuvieron condiciones estables. En los periodos interglaciares, la expansión del hábitat habría permitido la reconexión de estas poblaciones y un flujo genético suficiente para evitar una especiación completa. Esta dinámica de contracción y expansión de rangos, con la consiguiente persistencia en refugios, ha sido documentada en la historia evolutiva de otros grupos de vertebrados, así como anfibios en la región mesoamericana (Ceballos *et al.*, 2010; Arias *et al.*, 2025), lo que la convierte en un escenario plausible para la historia evolutiva de *Ecnomiohyla sp. nov.*

Esta idea se soporta con la conocida complejidad biogeográfica de las tierras altas de Mesoamérica, donde estudios con otras especies de anfibios, como las salamandras de los géneros *Bolitoglossa* (Rovito *et al.*, 2012) y *Nototriton* (Townsend *et al.*, 2010), han documentado una historia de vicarianza y aislamiento que ha resultado en múltiples linajes crípticos. De manera análoga, para *Ecnomiohyla sp. nov.*, esta misma dinámica de fragmentación pudo haber confinado a las poblaciones en refugios climáticos. Este modelo de persistencia en una red de refugios ha sido validado con metodologías más robustas en otros estudios, como los de Thomé *et al.*, (2010) para sapos en Brasil y Wielstra *et al.*, (2013) para tritones en Europa, donde el modelado de nicho ecológico y la filogeografía han demostrado que la contracción a refugios y posterior expansión

postglacial de dichas áreas, han configurado la estructura genética actual de sus poblaciones. Estos ejemplos, aunque en diferentes contextos geográficos, demuestran la posibilidad de que las poblaciones de *Ecnomiohyla sp. nov.* se hayan mantenido a través de una red de refugios interconectados, lo que explica su separación geográfica actual y la escasa divergencia genética observada.

La hipótesis de una conexión histórica entre La Pera y Nahá se ve respaldada por la evidencia en ecología de comunidades. Ochoa-Ochoa y Whittaker (2014) identificaron una alta similitud en la composición y estructura de las comunidades de anfibios entre ambas localidades, encontrando que compartían un número considerable de especies (21 en total) y presentaban patrones estructurales similares. Si bien los autores interpretaron este patrón como resultado de un filtrado ambiental compartido en el presente, la alta similitud florística y faunística entre estas dos localidades, es también indicativa de una historia compartida de estabilidad ambiental y conectividad. Este patrón puede reflejar una historia evolutiva común entre las especies presentes, sustentada en la estabilidad climática que permitió a estas regiones actuar como refugios. Así, el caso de *Ecnomiohyla sp. nov.* no sería un fenómeno aislado, sino parte de un patrón biogeográfico más amplio que vincula estas dos regiones a través de una dinámica histórica compartida, evidenciada a nivel de comunidades de anfibios.

8.2.2 Expansión postglacial desde un único refugio

Una segunda hipótesis alternativa para explicar el patrón de distribución de *Ecnomiohyla sp. nov.* plantea que la especie no persistió en una red de refugios interconectados, sino que lo hizo en un único refugio ancestral. Este escenario es razonable en el contexto de los cambios climáticos del Pleistoceno tardío y el Holoceno, donde el retorno de condiciones climáticas más cálidas y húmedas habría permitido la expansión del hábitat de bosque y, con ello, una rápida dispersión (Lozano-García *et al.*, 2013; Leyden, 1984). En este sentido, la colonización de nuevos hábitats adecuados como La Pera desde un núcleo de origen único, posiblemente Nahá dada su mayor extensión de selva, es un modelo de expansión postglacial que ha sido documentado para diversos grupos de fauna en México (Ceballos *et al.*, 2010).

Este modelo es coherente con el patrón general de dispersión sur-norte que ha sido documentado en diversos linajes de anfibios mesoamericanos (Savage, 1982; Rovito *et al.*, 2015; Arias *et al.*, 2025). Bajo este modelo, las poblaciones chiapanecas habrían colonizado regiones montañosas del norte del estado, como La Pera, aprovechando corredores de hábitat que se formaron en periodos postglaciales (Ceballos *et al.*, 2010). La similitud ecológica de estos nuevos ambientes con su área de origen habría facilitado la dispersión sin la necesidad de adaptaciones mayores.

Este patrón filogeográfico de expansión desde un refugio único ya ha sido documentado, incluso en contextos climáticos similares. Por ejemplo, estudios de la rana *Eupsophus calcaratus* en el sur de Sudamérica muestran evidencia genética de que la especie se retrajo a refugios glaciares y posteriormente se expandió desde ellos hacia regiones previamente cubiertas de hielo (Núñez *et al.*, 2011). De forma similar, poblaciones de *Rana sylvatica* en los Apalaches actuaron como refugios desde los cuáles se dispersó hacia el norte tras el retroceso de los glaciares (Lee-Yaw *et al.*, 2008). Estos patrones permiten considerar la posibilidad que *E. sp. nov.* haya seguido un proceso análogo, colonizando La Pera de manera reciente desde un refugio ancestral.

Si esta dispersión ocurrió de forma relativamente reciente en términos evolutivos y el flujo génico se mantuvo durante un tiempo (aunque hoy este interrumpido por la fragmentación del hábitat), es esperable que las poblaciones aún presenten alta similitud genética. Esto explicaría la ausencia de diferenciación morfológica significativa entre ellas y las distancias genéticas sutiles (0.4-0.8%) que se observan en los resultados, respaldando la idea de una expansión reciente, aun por precisar.

8.2.3 Distribución continua hasta épocas recientes

Un tercer escenario plantea la presencia de un corredor estable ubicado en el golfo de México, este corredor corresponde a selvas tropicales las cuales están bien reconocidas y ocurren dentro de provincias biogeográficas o ecorregiones con patrones faunísticos y florísticos compartidos (Olson *et al.*, 2001; Morrone, 2019) las cuales experimentaron contracciones en sus áreas de distribución durante el pleistoceno y holoceno (Ceballos *et al.*, 2010). Adicionalmente desde el siglo XX las selvas tropicales mexicanas están sujetas a una gran presión derivada de prácticas como la agricultura, la ganadería y la expansión de los asentamientos, reduciendo las selvas a fragmentos pequeños y aislados (Cayuela *et al.*, 2006; Arroyo-Rodríguez *et al.*, 2009; Lazos-Chavero *et al.*, 2021). Por lo tanto, el aislamiento observado entre las poblaciones de Nahá y La Pera es un fenómeno mucho más reciente, impulsado principalmente por las fluctuaciones climáticas recientes y el cambio de uso de suelo y la deforestación durante el siglo XX. Bajo esta hipótesis, la distribución disyunta sería el resultado de procesos climáticos antiguos, y de una fragmentación antropogénica que ha interrumpido la conectividad entre poblaciones que, hasta hace poco, formaban parte de una distribución más continua.

Esta idea se sustenta en que la pérdida y fragmentación del hábitat son las mayores amenazas para las poblaciones de anfibios a nivel global (Cushman, 2006). Dada su baja capacidad de dispersión y vulnerabilidad, los anuros son particularmente susceptibles a la desconexión genética provocada por la transformación del paisaje (Covarrubias *et al.*, 2021). La rápida y extensiva deforestación de las selvas tropicales del sur de México (Ramírez-Bautista *et al.*, 2021), habría fragmentado drásticamente las poblaciones de *Ecnomiohyla sp nov.*, aislándola en los pocos remanentes de bosque que persisten, interrumpiendo el flujo genético que pudo haber existido previamente entre estas localidades.

Esta hipótesis se ve reforzada por estudios en regiones cercanas, como el de Soria-Ortiz y Vázquez-Domínguez (2025) en la Sierra Madre del Sur de Oaxaca. Su investigación, basada en un mayor número de marcadores (nucleares) demuestra que la configuración del paisaje y su heterogeneidad, son predictores clave de la diferenciación genética en las especies de anuros. En este sentido, aunque la resolución del gen 16S no permite evaluar procesos recientes de aislamiento, los resultados de Soria-Ortiz y Vázquez-Domínguez (2025) sugieren que los paisajes fragmentados actuales podrían estar reforzando la separación de los linajes. El estudio subraya que la fragmentación tiene un impacto negativo en especies con limitada capacidad de dispersión, características que se ajustan a las especies de *Ecnomiohyla*; si sumamos su alta especialización en microhábitats arbóreos húmedos del dosel (p.ej. bromelias, cavidades arbóreas y cuerpos de agua temporales) complica significativamente su capacidad de flujo génico en hábitats fragmentados.

El hecho de que ambas poblaciones pertenezcan a la misma especie también respalda esta hipótesis, ya que la fragmentación reciente no habría proporcionado el tiempo geológico suficiente para que se acumularan diferencias moleculares significativas. La alta similitud genética entre ambas poblaciones (0.4-0.8%) podría ser, de hecho, la señal de una historia evolutiva compartida hasta hace muy poco tiempo. Sin embargo, para determinar si la fragmentación es un fenómeno reciente o el resultado de un proceso histórico más antiguo, sería indispensable integrar análisis de reloj molecular, tiempos de divergencia, modelado de nicho ecológico y realizar muestreos más exhaustivos en las áreas intermedias para explorar la posibilidad de que existan poblaciones no documentadas, lo que permitiría distinguir entre los escenarios paleoclimáticos discutidos anteriormente y el impacto antropogénico reciente.

Finalmente es razonable considerar que estos procesos puedan actuar de manera complementaria. En este sentido, la distribución actual de *Ecnomiohyla sp. nov.* reflejaría una historia biogeográfica compuesta, donde la persistencia en refugios y la expansión inducida por el clima y la fragmentación del hábitat contribuyeron como mecanismos complementarios para la persistencia de este linaje.

8.3 Diagnóstico morfológico y congruencia filogenética de *Ecnomiohyla sp. nov.*

La delimitación de *Ecnomiohyla sp. nov.* como una nueva entidad taxonómica se basa en la congruencia entre la evidencia morfológica y los resultados moleculares. Nuestra hipótesis inicial, sustentada en la posición de Chiapas como parte de Centroamérica Nuclear y en el rol histórico del Istmo de Tehuantepec como barrera biótica, sugería una estrecha afinidad morfológica y filogenética con *E. minera* (Guatemala). Sin embargo, la comparación del macho adulto de *E. minera* (USAC-3475), proveniente de Santa Cruz Barillas, Huehuetenango, Guatemala, con nuestros ejemplares, reveló diferencias morfológicas evidentes que contradicen esta suposición. La piel sobre la superficie dorsal del cuerpo en *E. minera* es fuertemente tuberculada, con múltiples tubérculos grandes y bien desarrollados, mientras que en *Ecnomiohyla sp. nov.* es rugosa y granulada. Adicionalmente, el menor tamaño y la ausencia de excrescencias nupciales queratinizadas en *E. sp. nov.* apoyan su estatus como una entidad taxonómica distinta a *E. minera*.

Asimismo, al comparar los ejemplares de La Pera con el macho adulto de la comunidad de Nahá, observamos varias similitudes morfológicas: un tamaño corporal comparable (62.8 mm La Pera – 66.8 mm Nahá de LHC), textura de la piel sobre la superficie dorsal del cuerpo rugosa a granulada, una mancha con forma de pata con tres dedos en la superficie dorsal de la cabeza, una proyección humeral, así como ausencia de excrescencias nupciales queratinizadas, estas últimas son caracteres exclusivos de machos. Estas similitudes no solo refuerzan una afinidad morfológica clara, sino que también son consistentes con los resultados de los análisis filogenéticos (Figura 7 y 8, Anexo 1).

Nuestros análisis posicionan a *Ecnomiohyla sp. nov.* como una especie hermana de *E. valancifer*, una relación que encuentra respaldo en ciertos rasgos morfológicos compartidos, como un tamaño corporal comparable y textura de piel dorsal rugosa. Aunque ambas especies comparten similitudes generales esperadas entre taxones hermanos, las diferencias son igualmente diagnósticas y congruentes con la separación genética: la piel de *E. valancifer* es mayormente lisa, y carece de la distintiva mancha en forma de pata con tres dedos en la cabeza, una característica presente en *E. sp. nov.*

Estas distinciones, tanto en el fenotipo como en el genotipo, respaldan la conclusión de que ambas especies han seguido trayectorias evolutivas independientes.

La situación con *E. echinata* es más ambigua. Mientras Mendelson *et al.*, (2015) indican que carece de espina humeral, pero presenta excrescencias nupciales negras, nuestras deducciones (aunque hipotéticas) basadas en su posible cercanía con *Ecnomiohyla sp. nov.* y *E. valancifer* y con las teorías de Vicarianza y Linaje relictos discutidos en segmentos anteriores, indicarían lo contrario. Esto sugiere que la variación intraespecífica y la disponibilidad de ejemplares adecuados para estudio son factores críticos que deben considerarse antes de utilizar estos caracteres como diagnósticos.

Finalmente, la comparación de *Ecnomiohyla sp. nov.* con el resto de las especies del género revela un patrón único de caracteres que la diferencian de manera consistente. Este patrón incluye la ausencia de excrescencias nupciales queratinizadas, una textura de piel dorsal rugosa a granulada y una mancha en forma de pata con tres dedos en la cabeza. Estas características, en conjunto, establecen una base morfológica distintiva que, sumada a las diferencias moleculares y la clara separación geográfica, justifica la descripción de *Ecnomiohyla sp. nov.*

8.4 Limitaciones y futuras direcciones

La delimitación de *Ecnomiohyla sp. nov.* como una especie no descrita, se basa en los principios de la taxonomía integrativa, que toma en cuenta la combinación de evidencia molecular y morfológica (Dayrat, 2005; Padial *et al.*, 2010). Si bien este es el enfoque estándar para la descripción de nuevas especies, se reconoce que la robustez del estatus taxonómico puede fortalecerse con la incorporación de líneas de evidencia adicionales, tales como delimitaciones basadas en modelos coalescentes o análisis de distancia genética (Yu *et al.*, 2017), los cuales se proponen como tareas futuras para consolidar el estatus de este nuevo linaje. El primer paso en este enfoque fue la generación de la base molecular, para lo cual se empleó el marcador mitocondrial 16S, ampliamente aceptado en la delimitación de especies en anfibios (Monaghan *et al.*, 2009; Vieites *et al.*, 2009; Batista *et al.*, 2014). Esta elección también permitió aprovechar las secuencias de

especies de *Ecnomiohyla* de Centroamérica previamente generadas por Batista *et al.*, (2014), quienes también utilizaron el mismo marcador.

Sin embargo, el análisis de un solo gen mitocondrial tiene limitaciones inherentes que deben considerarse, pues sacar conclusiones definitivas a partir del análisis de un solo gen puede resultar engañoso. El presente análisis, al basarse únicamente en el gen mitocondrial 16S, implica dos limitaciones principales. La primera tiene que ver con la tasa de evolución relativamente lenta de este marcador. La cual podría subestimar la diversidad genética reciente, una limitación documentada en estudios con anuros, donde se ha observado que el gen 16S, aunque útil para identificar linajes profundos, posee una resolución limitada para detectar divergencias recientes entre poblaciones (Vences *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2022), esto impide determinar con precisión el grado de aislamiento poblacional o la existencia de sublinajes más recientes.

La segunda limitación metodológica tiene que ver con la fuente de las muestras, al tratarse de un marcador mitocondrial, refleja únicamente la historia materna del linaje, la herencia uniparental del ADN mitocondrial hace que este marcador pueda no reflejar la historia evolutiva completa de la especie (Escobedo, 2021). Se conoce que el genoma mitocondrial heredado de la madre a menudo introgreza más rápidamente que los componentes del genoma nuclear heredados biparentalmente o paternalmente (Chan y Levin, 2005), estos fenómenos de introgresión mitocondrial, pueden inducir sesgos filogenéticos y sobreestimar la cercanía filogenética, por ejemplo, entre *E. sp. nov.* y *E. valancifer*. Aunque nuestros resultados sugieren un clado robusto, la falta de datos nucleares nos impide corroborar si este patrón corresponde con la totalidad del genoma. Por ello, la congruencia entre la morfología de los machos (proyección humeral y ausencia de excrescencias nupciales) discutida en secciones anteriores y la filogenia que hemos obtenido es una inferencia que, aunque válida, debe ser ratificada.

Para esclarecer estas relaciones sería necesario incorporar un enfoque multilocus, que incluya marcadores de genes nucleares. Estos genes, al ser heredados biparentalmente, proporcionan una visión más completa de la historia de especiación y la hibridación (Ruane *et al.*, 2014), permitiendo corroborar si los clados moleculares definidos por el 16S son consistentes en el genoma nuclear. A pesar de esta limitación, la biblioteca genética más amplia de *Ecnomiohyla* construida en el presente estudio puede servir como punto de referencia, tanto para investigaciones futuras como para la identificación de especies dentro del género. Además, un muestreo geográfico más exhaustivo de las zonas intermedias y de las regiones adyacentes a los registros documentados sería crucial para descartar la existencia de poblaciones no documentadas y para poner a prueba las hipótesis biogeográficas discutidas en este trabajo (vicarianza, persistencia en refugios y expansión postglacial).

IX.- CONCLUSIONES

- La inferencia filogenética, respaldada por la evidencia morfológica, permite delimitar a *Ecnomiohyla sp. nov.* como un nuevo linaje no descrito previamente.
- Las relaciones filogenéticas obtenidas muestran que *Ecnomiohyla sp. nov.* y *E. valancifer*, conforman un linaje mexicano bien diferenciado de las especies centroamericanas, lo que evidencia la singularidad evolutiva del grupo en el sur-sureste de México.
- La disyunción geográfica observada entre las poblaciones de *Ecnomiohyla sp. nov.*, refleja un patrón de distribución fragmentada que podría estar asociado a procesos históricos aún no determinados, los cuales deberán evaluarse mediante análisis poblacionales y biogeográficos.
- Los patrones observados en la filogenia y distribución de las especies reflejan una historia evolutiva compleja en el sur-sureste de México, cuya interpretación requiere integrar futuros análisis biogeográficos y de modelado ecológico.
- La posición filogenética ambigua de *E. miliaria* dentro de una politomía bien soportada evidencia la necesidad de ampliar el muestreo y los datos moleculares para resolver sus relaciones internas con otras especies del género.

- El análisis morfológico reveló que los ejemplares de *Ecnomiohyla sp. nov.* comparten con *E. valancifer* una apariencia general similar, pero se distinguen por una piel dorsal rugosa, la presencia de una mancha cefálica en forma de pata con tres dedos y la ausencia de excrescencias nupciales queratinizadas. Estas diferencias son consistentes con las relaciones filogenéticas obtenidas y respaldan la delimitación de *E. sp. nov.* como un nuevo linaje no descrito previamente.

X.- RECOMENDACIONES

- Ampliar el muestreo molecular y geográfico del género *Ecnomiohyla* en Mesoamérica, especialmente en regiones poco exploradas del sur de México (Sierra Juárez de Oaxaca y Chimalapas) y la región conocida como la Selva Negra en Chiapas, para esclarecer las relaciones filogenéticas no resueltas y detectar posibles poblaciones no documentadas.
- Incorporar marcadores moleculares adicionales (nucleares) con mayor poder resolutivo para reevaluar la posición filogenética de especies y profundizar en la historia evolutiva de los linajes relictos.
- Realizar estudios de nicho ecológico, modelado de distribución histórica, reloj molecular y tiempos de divergencia, para probar hipótesis sobre la persistencia en refugios pleistocénicos y eventos de dispersión postglacial en la distribución actual del grupo.
- Fomentar estudios de historia natural, comportamiento reproductivo y uso de microhábitat en *Ecnomiohyla*, dado que estos aspectos siguen siendo escasamente documentados y son clave para entender procesos de especiación y aislamiento.
- Promover la conservación de los hábitats donde habitan especies endémicas como *Ecnomiohyla sp. nov.* y *E. valancifer*, considerando su distribución restringida, el aislamiento de sus poblaciones y su potencial valor como linajes evolutivos únicos.

XI.- LITERATURA CITADA

- AmphibiaWeb. 2025. <<https://amphibiaweb.org/lists/Hylidae.shtml>> University of California, Berkeley, CA, USA. Consultado el 12 de mayo 2025.
- Arias, E. Crawford, A. J., Hertz, A. y Parra, G. 2025. Deep cryptic diversity in the *Craugastor podiciferus* Species Group (Anura: Craugastoridae) of Isthmain Central America revealed by mitochondrial and nuclear data. *PeerJ*. 13: 1-33.
- Arroyo-Rodríguez, V., Pineda, E., Escobar, F., y Benítez-Malvido, J. 2009. Value of Small Patches in the Conservation of Plant-Species Diversity in Highly Fragmented Rainforest. *Conservation Biology*. 23(3): 729-739.
- Avise, J. C. 2004. Molecular Markers, Natural History, and Evolution. 2nd edn. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Badillo, E. 2018. Efecto del Istmo de Tehuantepec en la estructura y diversidad genética de *Carollia sowelli* (Chiroptera: Phyllostomidae) en México. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Los Reyes, Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, México.
- Batzoglou, S., Pattengale, N., Alipour, M., Bininda-Emonds, O. P., Moret, B. E. y Stamatakis, A. 2009. How Many Bootstrap Replicates Are Necessary?. *Research in Computational Molecular Biology*. 17: 337-54.
- Barber, B. R. y Klicka, J. 2010. Two pulses of diversification across the Isthmus of Tehuantepec in a montane Mexican bird fauna. *Proc. R. Soc. B*. 277: 2675-2681.
- Barrio-Amorós, C. L., Sánchez-Ochoa, D. J., Akcali, C. K., Flores-Villela, O. A., Palacios-Aguilar, R., y Pérez-Mendoza, H. A. 2024. The guatemala tree frog, *Ecnomiohyla minera* (ANURA: HYLIDAE), an addition to the herpetofauna of Mexico. *Revista Latinoamericana de Herpetología*. 7: 50-54.
- Batista, A., Hertz, A., Mebert, K., Köhler, G., Lotzkat, S., Ponce, M y Vesely, M. 2014. Two new fringe-limbed frogs of the genus *Ecnomiohyla* (Anura: Hylidae) from Panamá. *Zootaxa*. 3826: 449–474.
- Brown, K. S. 1982. Paleoecological and regional patterns of evolution in Neotropical forest butterflies. In: G. T. Prance (Ed.). Biological diversification in the tropics. Columbia University Press, New York, NY, USA. Pp. 255-308.

- Bryan, H. N. 2001. Character polarity and the rooting of cladograms. In: Wagner, G. P. (Ed.). *The Character Concept in Evolutionary Biology*. Academic Press, San Diego, Estados Unidos. Pp. 319-341.
- Campbell, J. A. 1999. Distribution patterns of amphibians in Middle America. In: Duellman, W.E. (Ed.), *Patterns of Distribution of Amphibians, A Global Perspective*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, Pp. 111–210.
- Caviedes-Solis I.W. y Nieto-Montes de Oca A. 2018. A multilocus phylogeny of the genus *Sarcohyala* (Anura: Hylidae), and an investigation of species boundaries using statistical species delimitation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 118: 184–193.
- Cayuela, L., Benayas, J., y Echeverría, C. 2006. Clearance and fragmentation of tropical montane forests in the Highlands of Chiapas, Mexico (1975-2000). *Forest Ecology and Management*. 226: 208–218.
- Ceballos, G., Arroyo-Cabrales, J. y Ponce, E. 2010. Effects of Pleistocene environmental changes on the distribution and community structure of the mammalian fauna of Mexico. *Quaternary Research*. 73(2010): 464-473.
- Chan, K. M. y Levin, S. A. 2005. Leaky prezygotic isolation and porous genomes: rapid introgression of maternally inherited DNA. *Evolution*. 59: 720-729
- Chan, K. O., Hertwig, S. T., Neokleous, D. N., Flury, J. M. y Brown, R. M. 2022. Widely used, short 16S rRNA mitochondrial gene fragments yield poor and erratic results in phylogenetic estimation and species delimitation of amphibians. *BMC Ecology and Evolution*. (2022): 1-9.
- Crawford, A. J., Lips, K. R. y Bermingham, E. 2010. Epidemic disease decimates amphibian abundance, species diversity, and evolutionary history in the highlands of central Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107: 13777–13782.
- Crawford, A. J., Cruz, C., Griffith, E., Ross, H., Ibáñez, R., Lips, K. R., Driskell, A. C., Bermingham, E. y Crump, P. 2013. DNA barcoding applied to ex situ tropical amphibian conservation programme reveals cryptic diversity in captive populations. *Molecular Ecology Resources*. 13: 1005–1018.

- Covarrubias, S., González, C. y Gutiérrez-Rodríguez, C. 2021. Effects of natural and anthropogenic features on functional connectivity of anurans: a review of landscape genetics studies in temperate, subtropical and tropical species. *Journal of Zoology*. 313(2021): 159-171.
- Cushman, S. A. 2006. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus. *Biological Conservation*. 28(2006): 231-240.
- Daudin, F. M. 1800. Histoire Naturelle des Quadrupèdes Ovipaires. Livraison 1. Marchant et Cie, Paris.
- Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*. 85(3): 407-417.
- Duellman, W. E. 1960. Redescription of *Hyla valancifer*. Studies of American hylid frogs. III. *Herpetologica*. 16: 55–57.
- Duellman, W. E. 1961. A new species of fringe-limbed tree frog from Mexico. Studies of American hylid frogs VIII. *Transactions of the Kansas Academy of Science*. 64: 349–352.
- Duellman, W. E. y Trueb, L. 1986. Biology of Amphibians. New York. McGraw-Hill.
- Duellman, W. E. 2001. Hylid frogs of Middle America. Vol. 1 y 2. Society for the Study of Amphibians and Reptiles in the Natural History Museum of the University of Kansas. Kansas. E. U.
- Duellman, W. E., Marion, A. M. y Hedges, S. B. 2016. Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). *Zootaxa*. 4104: 1–109.
- Escobedo, R. G. 2021. Evaluación del estado taxonómico de una población de *Rheohyla miotympanum* (Anura: Hylidae) del norte de Chiapas, México. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.
- Faivovich, J., Haddad, C. F. B., Garcia, P. C. A., Frost, D. R., Campbell, J. A., Wheeler, W. C. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 294: 1–240.

- Faivovich, J., Pereyra, M. O., Luna, M. C., Hertz, A., Blotto, B. L., Vásquez-Almazán, C. R., McCranie, J. R., Sánchez, D. A., Baeta, D., Araujo-Vieira, K., Köhler, G., Kubicki, B., Campbell, J. A., Frost, D. R., Wheeler, W. C. y Haddad, C. F. B. 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: 1–32.
- Farrera, M. R. 2014. Patrones filogenéticos del género *Mustelus* en el Pacífico nororiental. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. Ensenada, Baja California, México.
- Firschein, I. L. y Smith, H. M. 1956. A new fringe-limbed Hyla (Amphibia: Anura) from a new faunal district of Mexico. *Herpetologica*. 12: 17–21.
- Flores-Villela, O. y Martínez-Salazar, E. 2009. Historical explanation of the origin of the herpetofauna of México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 80: 817-833.
- Fouquet, A., Gilles, A., Vences, M., Marty, C., Blanc, M. y Gemmell, N. J. 2007. Underestimation of species richness in neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. *PLoS ONE*. 2(10): 1-10.
- Frost, D. 2025. Amphibian Species of the World 6.2, an Online Reference. Amphibian Species of the World (amnh.org). Consultado el 11 de mayo de 2025.
- García, M. A. 2015. Diversidad de anfibios en la Zona Sujeta a Conservación Ecológica La Pera, Berriozábal, Chiapas. Tesis de Licenciatura. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.
- Grandcolas, P., Nattier, R. y Trewick, S. 2014. Relict species: a relict concept?. *Trends in Ecology & Evolution*. 29(12): 655-663.
- Gregory, T. R. 2008. Understanding Evolutionary Trees. *Evolution: Education and Outreach*. 1: 121-137.
- Gosner, K. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*. 16: 183-190.
- González-Porter, G. P., Maldonado, J. E., Flores-Villela, O., Vogt, R. C., Janke, A., Fleischer, R. C. y Hailer, F. 2013. Cryptic Population Structuring and the Role of the Isthmus of Tehuantepec as a Gene Flow Barrier in the Critically Endangered Central American River Turtle. *PLoS ONE*. 8(9): 1-12.

- Gutiérrez-García, T. A. y Vázquez-Domínguez, E. 2013. Consensus between genes and stones in the biogeographic and evolutionary history of Central America. *Quaternary Research*. 79(3): 311-324.
- Haas, A. 2003. Phylogeny of frogs as inferred from primarily larval characters (Amphibia: Anura). *Cladistics*. 19: 23-89.
- Halffter, G. 2017. La zona de transición mexicana y la megadiversidad de México: del marco histórico a la riqueza actual. *Dugesiana*. 24(2): 77-89.
- Halffter, G. y Morrone, J. J. 2017. An analytical review of Halffter's Mexican transition zone, and its relevance for evolutionary biogeography, ecology and biogeographical regionalization. *Zootaxa*. 4226(1): 001-046.
- Harvey, P. H. y Pagel, M. D. 1991. The comparative Method in Evolutionary Biology. Oxford, Reino Unido: Oxford University.
- Hernández-Santana, J. R., Ortiz-Pérez, M. A. y Zamorano-Orozco, J. J. 1995. Regionalización morfoestructural de la Sierra Madre del Sur, México. *Investigaciones Geográficas*. 31: 45-67.
- IUCN. 2025. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2025-01. Available at: <https://www.iucnredlist.org>. Consultado el 16 de julio de 2025.
- Herron, J. C. y Freeman, S. 2014. Evolutionary analysis. Glenview, Estados Unidos: Pearson Education.
- Jansen, M., Bloch, R., Schulze, A. y Pfenninger, M. 2011. Integrative inventory of Bolivia's lowland anurans reveals hidden diversity. *Zoologica Scripta*. 40: 567–583.
- Jiang, W., Zhu, J., Song, C., Li, X., Yang, Y y Yu, W. 2014. Molecular phylogeny of the butterfly genus *Polytremis* (Hesperiidae, Hesperinae, Baorini) in China. *PLoS ONE*. 8(12): 1-15.
- Johnson, J. D., V. Mata-Silva, E. García-Padilla, y L. D. Wilson. 2015. The herpetofauna of Chiapas, Mexico: composition, physiographic distribution, and conservation status. *Mesoamerican Herpetology*. 2: 272–329
- Kamei, R. G., Wilkinson, M., Gower, D. J., y Biju, S. D. 2009. Three new species of striped *Ichthyophis* (Amphibia: Gymnophiona: Ichthyophiidae) from the northeast Indian states of Manipur and Nagaland. *Zootaxa*. 2267: 26–42.
- Köhler, G. 2011. Amphibians of Central America. Herpeton Verlag, Offenbach, Germany.

- Lazos-Chavero, E., Meli, P., y Bonfil, C. 2021. Vulnerabilities and Threats to Natural Forest Regrowth: Land Tenure Reform, Land Markets, Pasturelands, Plantations, and Urbanization in Indigenous Communities in Mexico. *Land*. 10(12): 1340.
- Lee-Yaw, J. A., Irwin, J. T. y Green, D. M. 2008. Postglacial range expansion from northern refugia by the wood frog, *Rana sylvatica*. *Molecular Ecology*. 17: 867-884.
- Leopardi-Verde, C. L., Carnevali, G. y Romero-González, G. A. 2017. A phylogeny of the genus *Encyclia* (Orchidaceae: Laeliinae), with emphasis on the species of the Northern Hemisphere. *Journal of Systematics and Evolution*. 55(2): 110-123.
- Leopardi-Verde, C. L. y Escobedo-Sarti, G. J. 2021. Filogenias: conceptos y generalidades. *Tequío*. 4(11): 7-25.
- Leyden, B. 1984. Guatemalan forest synthesis after Pleistocene aridity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 81: 4856-4859.
- Lozano-García, S., Torres-Rodríguez, E., Ortega, B., Vázquez, G. y Caballero, M. 2013. Ecosystem responses to climate and disturbances in western central Mexico during the late Pleistocene and Holocene. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. 370(2013): 184-195.
- Luna-Reyes, R., L. Canseco-Márquez y E. Hernández-García. 2013. Los reptiles. En: La biodiversidad en Chiapas: Estudio de Estado. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) y Gobierno del Estado de Chiapas, México. Pp. 319-328.
- Maddison, W. P., Donoghue, M. J. y Maddison, D. R. 1984. Outgroup analysis and parsimony. *Systematic Zoology*. 33: 83-103.
- Maddison, W. P. 1989. Reconstructing character evolution on polytomous cladograms. *Cladistics*. 5: 365-377.
- Mata-Silva, V., DeSantis, D.L., García-Padilla, E., Johnson, J.D. y Wilson, L.D. 2019. The endemic herpetofauna of Central America: a casualty of anthropocentrism. *Amphibian & Reptile Conservation*. 13(1): 1-64.
- McCranie, J. R., Townsed, J. H. y Wilson, L. D. 2003. *Hyla miliaria* (Anura: Hylidae) in Honduras, with Notes on Calling Site. *Caribbean Journal of Science*. 39(3): 398-399.

- Melgar-Martínez, A. I., Ruan-Soto, F., Chankin-Chankayun, E., García-Padilla, E., Villalobos-Juárez, I., Mata-Silva, V., López-Esquivel, E. A., Fucsko, L. A., Lavariega, M. C., Johnson, J. D., Lazcano, D. y Wilson, L. D. 2023. The amphibians and reptiles of the northern selva lacandona: Nahá and Metzabok, Ocosingo, Chiapas, México; with some ethnoherpetological notes. *Biología y Sociedad, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL*. 6(12): 48-78.
- Mendelson III, J. R., Savage, J. M., Griffith, E., Roos, H., Kubicki, B. y Gagliardo, R. 2008. Spectacular New Gliding Species of *Ecnomiohyla* (Anura: Hylidae) from Central Panama. *Journal Herpetology*. 42(4): 750-759.
- Mendelson III, J. R., Eichenbaum, A. y Campbell, J. A. 2015. Taxonomic Review of the Populations of the Fringe-Limbed Treefrogs (Hylidae: *Ecnomiohyla*) in Mexico and Nuclear Central America. *South American Journal of Herpetology*. 10(3): 187-194.
- Mendoza, A.M., Bolívar-García, W., Vázquez-Domínguez, E., Ibáñez, R. y Parra-Olea, G. 2019. The role of Central American barriers in shaping the evolutionary history of the northernmost glassfrog, *Hyalinobatrachium fleischmanni* (Anura: Centrolenidae). *PeerJ*. 7: 1-28.
- Metcalfe, S. E., O'Hara, S. L., Caballero, M. y Davies S. J. 2000. Records of Late Pleistocene-Holocene climatic change in Mexico – a review. *Quaternary Science Reviews*. 19(2000): 699-721.
- Miguez-Gutiérrez, A., Castillo, J., Márquez, J. y Goyenechea, I. 2013. Biogeografía de la Zona de Transición Mexicana base en un análisis de árboles reconciliados. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 84: 215-224.
- Miller, M. P., Haig, S. M. y Wagner, R. S. 2006. Phylogeography and Spatial Genetic Structure of the Southern Torrent Salamander: Implications for Conservation and Management. *Journal of Heredity*. 97: 561–570.
- Monaghan, M. T., Wild, R., Elliot, M., Fujisawa, T., Balke, M., Inward, D. J. G., Lees, D. C., Ranaivosolo, R., Eggleton, P., Barraclough, T. G. y Vogler, A. P. 2009. Accelerated species inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation. *Systematic Biology*. 58: 298–311.
- Moritz, C. 1994. Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. *Molecular Ecology*. 3: 401–411.

- Morrone, J. J. 2000. El lenguaje de la cladística, México, UNAM.
- Morrone, J. J. 2019. Regionalización biogeográfica y evolución biótica de México: encrucijada de la biodiversidad del Nuevo Mundo. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 90(2019): 1-68.
- Mulcahy, D. G., Morrill, B. H. y Mendelson, J. R. 2006. Historical biogeography of lowland species of toads (Bufo) across the Trans-Mexican Neovolcanic Belt and the Isthmus of Tehuantepec. *Journal of Biogeography*. 33: 1889-1904.
- Müllerried, F. K. G. 1982. La Geología de Chiapas. Gobierno constitucional del Estado de Chiapas. México. D. F.
- Muñoz-Alonso, A. A. 2010. Riqueza, diversidad y estatus de los anfibios amenazados en el sureste de México; una evaluación para determinar las posibles causas de la declinación de sus poblaciones. ECOSUR-Universidad de Arizona-CEPF. Informe final. 55 pp.
- Muñoz-Alonso, L. A., N. López-León, A. Hórvath y Luna-Reyes, R. 2013. Los anfibios. En: *La biodiversidad en Chiapas: Estudio de Estado*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) y Gobierno del Estado de Chiapas, México. Pp. 305-318.
- Myers, C. W. y Duellman, W. E. 1982. A new species of Hyla from Cerro Colorado, and other tree frog records and geographic notes from western Panama. *American Museum Novitates*. 2752: 1–32.
- Nixon, K. y Ochoterena, H. 2001. "Taxonomía tradicional, cladística y construcción de hipótesis filogenéticas". En: Hernández, H. M., García-Aldrete, A. N., Álvarez, F. y Ulloa, M. (compiladores). Enfoques contemporáneos para el estudio de la biodiversidad. Ediciones Científicas Universitarias, UNAM/Fondo de Cultura Económica. Pp: 15-33.
- Ochoa-Ochoa, L. M. y O. Flores-Villela. 2006. Áreas de diversidad y endemismo de la herpetofauna mexicana. UNAM-CONABIO, México, D.F.
- Ochoa-Ochoa, L. M., Campbell, J. A. y Flores-Villela, O. 2014. Patterns of richness and endemism of the Mexican herpetofauna, a matter of spatial scale?. *Biological Journal of the Linnean Society*. 111: 305-316.

- Ochoa-Ochoa, L. M. y Whittaker, R. J. 2014. Spatial and temporal variation in amphibian metacommunity structure in Chiapas, México. *Journal of tropical Ecology*. 30: 537-549.
- Olson, D. M., Dinerstein, E., Wikramanayake, E. D., Burgess, N. D., Powell, G. V. N., Underwood, E. C., D'amico, J. A., Itoua, I., Strand, H. E., Morrison, J. C., Loucks, C. J., Allnutt, T. F., Ricketts, T. H., Kura, Y., Lamoreux, J. F., Wettengel, W. W., Hedao, P., y Kassem, K. R. 2001. Terrestrial Ecoregions of the World: A New Map of Life on Earth: A new global map of terrestrial ecoregions provides an innovative tool for conserving biodiversity. *BioScience*. 51(11), 933–938.
- Padial, J. M., Miralles, A., De la Riva, I. y Vences, M. 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*. 7:16.
- Pimenta, B. V. S., Haddad, C. F. B., Nascimento, L. B., Cruz, C. A. G. y Pombal, J. P. 2005. Comment on “Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide”. *Science*. 309, 1999.
- Portik, D. M., Streicher, J. W. y Wiens, J. J. 2023. Frog phylogeny: A time-calibrate, species-level tree based on hundreds of loci and 5,242 species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 188(2023): 1-72.
- Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*. 25: 1253-1256.
- Prado, B. R., Pozo, C., Valdez-Moreno, M. y Hebert, P. D. N. 2011. Beyond the colours: Discovering hidden diversity in the Nymphalidae of the Yucatan Peninsula in Mexico through DNA barcoding. *PLoS ONE*. 6(11): 1-11.
- Pyron, R. A. y Wiens, J. J. 2011. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2,800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 61: 543–583.
- Ramírez-Bautista, A., U. Hernández-Salinas, R. Cruz-Elizalde y C. Berriozabal-Islas. 2021. Factores que amenazan la biodiversidad de anfibios y reptiles. En: La biodiversidad en Hidalgo. Estudio de Estado. CONABIO, México, Pp. 411-420.
- Real, V. M. 2020. Listado taxonómico y guía de identificación de la herpetofauna en el Área de Protección de Flora y Fauna en Nahá, Chiapas. Tesis de licenciatura.

Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Los Reyes, Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, México.

- Reynoso, V. H., R. Paredes-León y A. González-Hernández. 2011. Anfibios y reptiles de Chiapas con comentarios sobre los reportes y estudios de diversidad herpetofaunística en la región, su endemismo y conservación. En Chiapas: estudios sobre su diversidad biológica, F. Álvarez (ed.). Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. Pp. 459-509.
- Ríos, C. A., 2014. Efectos del pleistoceno en los patrones de distribución de la biota en las tierras bajas de Mesoamérica. Tesis de doctorado en ciencias. Facultad de Ciencias, Biología Evolutiva, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.
- Ron, S. R., Venegas, P. J., Ortega-Andrade, H. M., Gagliardi-Urrutia, G. y Salerno, P. E. 2016. Systematics of *Ecnomiohylla 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 Huelsenbeck, J. P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 19: 1572-1574.
- Rovito, S. M., Parra-Olea, G., Vázquez-Almazán, C. R., Luna-Reyes, R. y Wake, D. B. 2012. Deep divergences and extensive phylogeographic structure in a clade of lowland tropical salamanders. *BMC Evolutionary Biology*. 12:255.
- Rovito, S. M., Vázquez-Almazán, C. R., Papenfuss, T. J., Parra-Olea, G. y Wake, D. B. 2015. Biogeography and evolution of Central American cloud forest salamanders (Caudata: Plethodontidae: Cryptotriton), with the description of a new species. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 175: 150–166.
- Ruane, S., Bryson, R. W., Pyron, R. A. y Burbrink, F. T. 2014. Coalescent species delimitation in milksnakes (genus *Lampropeltis*) and impacts on phylogenetic comparative analyses. *Systematic Biology*. 63: 231-250.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Santos, J. C., Coloma, L. A., Summers, K., Caldwell, J. P., Ree, R. y Cannatella, D. C. 2009. Amazonian Amphibian Diversity Is Primarily Derived from Late Miocene Andean Lineages. *PLoS Biology*. 7(3): 0448-0461.
- Savage, J. M. 1982. The enigma of the Central American Herpetofauna: dispersals or vicariance?. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 69(3): 464-547.
- Savage, J. M. 2002. The Amphibians and Reptiles of Costa Rica: A Herpetofauna between two Continents, between two Seas. University of Chicago Press, Chicago.
- Savage, J. M. y Kubicki, B. 2010. A new species of fringe-limb frog, genus *Ecnomiohyla* (Anura: Hylidae), from the Atlantic slope of Costa Rica, Central America. *Zootaxa*. 2719: 21-34.
- Sites, J. W. y Marshall, J. C. 2003. Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology & Evolution*. 18: 462–470.
- Smith, S. A., de Oca, A. N. M., Reeder, T. W. y Wiens, J. J. 2007. A phylogenetic perspective on elevational species richness patterns in Middle American treefrogs: why so few species in lowland tropical rainforests?. *Evolution*. 61: 1188–1207
- Soria-Ortiz, G. y Vázquez-Domínguez, E. 2025. Landscape predictors of the genetic diversity and differentiation of four anuran species inhabiting anthropized environments. *Landscape Ecology*. (2025): 40-148.
- Sosa, V. 2009. El Árbol de la Vida. *Ciencia. Academia Mexicana de Ciencias*. 60 (4): 44-53.
- Swofford, D. L., Olsen, G. J., Waddell, P. J. y Hillis, D. M. 1996. Phylogenetic inference. In: Hillis, D. M., Moritz, C. and Mable, B. (Eds.). *Molecular Systematics*. Sinauer Associates. Pp. 407-425.
- Tamura, K., Stecher, G. y Kumar, S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology Evolution*. 38(7): 3022–3027.
- Thomé, M. T., Zamudio, K. R., Giovanelli, J. G. R., Haddad, C. F. B., Baldissera Fr, F. A. y Alexandrino, J. 2010. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 55(2010): 1018-1031.
- Thorp, C., Phipps, C. D., Lonsdale, G., Arrivillaga, C., Brown, T. W. y Snyder, A. 2021. *Ecnomiohyla salvaje* Hylidae (Wilson, McCranie & Williams 1985) in Cusuco

- National Park, Honduras: morphological descriptions of adults and metamorphs with notes on ecology, natural history, and the conservation implications of amphibian chytrid fungus (Bd). *Journal of Mesoamerican Biology Special Issue: Biodiversity of the Cordillera del Merendón*. 1: 70-88.
- Toledo, V. M. 1976. Los cambios climáticos del Pleistoceno y sus efectos sobre la vegetación tropical cálida y húmeda de México. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F.
- Toledo, V. M. 1982. Pleistocene, changes of vegetation in tropical México. In: G. T. Prance (Ed.). *Biological diversification in the tropics*. Columbia University Press, New York, EUA. Pp 93-111.
- Townsend, J. H., Butler, J. M., Wilson, L.D. y Austin, J. D. 2010. A distinctive new species of moss salamander (Caudata: Plethodontidae: *Nototriton*) from an imperiled Honduran endemism hotspot. *Zootaxa*. 2434: 1–16.
- Townsend, J. H., Medina-Flores, M., Wilson, L. D., Jadin, R. C. y Austin, J. D. 2013. A relict lineage and new species of green palm-pitviper (Squamata, Viperidae, *Bothriechis*) from the Chortís Highlands of Mesoamerica. *ZooKeys*. 298: 77–105
- Valencia-Zuleta, A., Jaramillo-Martínez, A. F., Cardona-Botero, V. E. y Castro-Herrera, F. 2016. Geographic extension of *Ecnomiohyla miliaria* (Cope, 1886) (Anura: Hylidae) for Colombia. *Herpetology Notes*. 9: 23-26.
- Vásquez-Almazán, C. R., Herman, T. A. y López, E. R. 2014. Geographic Distribution: *Ecnomiohyla minera*. *Herpetological Review*. 45:86.
- Vences, M., Thomas, M., Bonett, R. M. y Vieites, D. R. 2005. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: Chances and challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. 360: 1859–1868.
- Verma, S. P., López-Loera, H., Subramanyam, K. S. V. y Manikyamba, C. 2020. Geochemistry, petrogenesis, and tectonic setting of the Los Tuxtlas Volcanic Field, Mexico. *Geological Journal*. 2020: 1–17.
- Vieites, D. R., Wollenberg, K. C., Andreone, F., Köhler, J., Glaw, F. y Vences, M. 2009. Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106: 8267–8272.

- Watters, J., Cummings, S.T., Flanagan, R.L. y Siler, C. D. 2016. Approach Review of morphometric measurements used in anuran species descriptions and recommendations for a standardized approach. *Zootaxa*. 4072 (4): 477–495.
- Wendt, T. 1987. Las selvas de Uxpanapa, Veracruz-Oaxaca, México: Evidencia de refugios florísticos Cenozoicos. *Anales Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica*. 58: 29-54.
- Whitfield, J. y Lockhart, P. J. 2007. Deciphering ancient rapid radiations. *TRENDS in Ecology and Evolution*. 22(5): 258-265.
- Wickramasinghe, M. J. L., Vidanapathirana, D. R, Wairiyarathne, S., Rajeev, G., Chanaka, A., Pastorini, J., Chathuranga, G. y Wickramasinghe, N. 2013. Lost and found: One of the world's most elusive amphibians, *Pseudophilautus stellatus* (Kelaart 1853) rediscovered. *Zootaxa*. 3620(1): 112–128.
- Wielstra, B., Crnobrnja-Isailovic, J., Litvinchuk, S. N., Reijnen, B. T., Skidmore, A. K., Sotiropoulos, K., Toxopeus, A. G., Tzankov, N., Vukov, T. y Arntzen, J. W. 2013. Tracing glacial refugia of *Triturus* newts based on mitochondrial DNA phylogeography and species distribution modeling. *Frontiers in Zoology*. 10(13): 1-14.
- Wiens, J. J. y Penkrot, T. A. 2002. Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (*Sceloporus*). *Systematic Biology*. 51: 69–91.
- Wiens, J. J., Fetzner, J. W., Parkinson, C. L. y Reeder, T. W. 2005. Hylid frog phylogeny and sampling strategies for speciose clades. *Systematic Biology*. 54: 719–748.
- Wiens, J. J., Kuczynski, C. 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*. 55, 871–882.
- Wiley, E. O. y Lieberman, B. S. 2011. *Phylogenetics: Theory and Practice of Phylogenetic Systematics*. : Willey-Blackwell. Hoboken, United States of America.
- Wilson, L. D., McCranie, J. R. y Williams, K. L. 1985. Two new species of fringe-limbed hylid frogs from Nuclear Middle America. *Herpetologica*. 41: 141–150.

- Witt, C., Brichau, S. y Carter, A. 2012. New constraints on the origin of the Sierra Madre de Chiapas (south Mexico) from sediment provenance and apatite thermochronometry. *TECTONICS*. 31(6): 1-15.
- Yu, G., Rao, D., Matsui, M. y Yang, J. 2017. Coalescent-based delimitation outperforms distance-based methods for delineating less divergent species: the case of *Kurixalus odontotarsus* species group. *Scientific Reports*. 7: 16124.
- Yuan, Z. Y., Zhou, W. W., Chen, X., Poyarkov, N. A., Chein, H. M., Jang-Liaw, N. H., Chou, W. H., Matzke, N. J., Iizuka, K., Min, M. S., Kuzmin, S. L., Zhang, Y. P., Cannatella, D. C., Hillis, D. M. y Che, J. 2016. Spatiotemporal Diversification of the True Frogs (Genus *Rana*): A Historical Framework for a Widely Studied Group of Model Organisms. *Syst. Biol.* 65(5): 824-842.

XII.- ANEXOS

Anexo 1. Estimaciones de divergencia evolutiva entre secuencias del gen mitocondrial 16S de *Ecnomiohyla* spp. usadas en el análisis filogenético. Números debajo de la diagonal son las p-distancias y números por encima son el error estándar estimado.

	Especies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	<i>E. minera</i> - Naha (MZFC-36211)		0.003	0.004	0.008	0.008	0.011	0.010	0.010	0.010	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.015	0.016
2	<i>E. sp</i> - La Pera (ECO-SCH-4859)	0.004		0.004	0.008	0.008	0.010	0.010	0.010	0.010	0.013	0.013	0.013	0.013	0.014	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.015	0.016
3	<i>E. sp</i> - La Pera (ECO-SCH-4854)	0.008	0.008		0.008	0.008	0.011	0.011	0.011	0.010	0.013	0.013	0.013	0.013	0.014	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.015	0.016	
4	<i>E. valancifer</i> (ECO-SCH-4855)	0.033	0.033	0.037		0.004	0.011	0.011	0.011	0.011	0.013	0.013	0.013	0.012	0.014	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.016	0.016	
5	<i>E. valancifer</i> (ECO-SCH-4856)	0.033	0.033	0.037	0.008		0.011	0.011	0.011	0.011	0.013	0.013	0.013	0.012	0.014	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.016	0.016	
6	<i>E. salvaje</i> (USAC-4434)	0.057	0.057	0.062	0.064	0.064		0.002	0.004	0.004	0.011	0.011	0.012	0.012	0.013	0.012	0.013	0.013	0.013	0.013	0.015	0.016	
7	<i>E. salvaje</i> (USAC-4435)	0.055	0.055	0.060	0.062	0.062	0.002		0.004	0.004	0.012	0.012	0.012	0.012	0.013	0.012	0.013	0.013	0.013	0.013	0.015	0.017	
8	<i>E. minera</i> (USAC-4433)	0.054	0.054	0.058	0.058	0.058	0.009	0.006		0.004	0.012	0.012	0.012	0.013	0.013	0.012	0.013	0.013	0.013	0.013	0.016	0.017	
9	<i>E. minera</i> (USAC-3475)	0.056	0.056	0.060	0.064	0.064	0.010	0.008	0.006		0.012	0.012	0.012	0.012	0.013	0.012	0.013	0.013	0.013	0.013	0.015	0.017	
10	<i>E. miliaria</i> (KRL0758)	0.088	0.086	0.092	0.092	0.092	0.070	0.072	0.069	0.076		0.000	0.004	0.013	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.016	0.016	
11	<i>E. miliaria</i> (SIUC6998)	0.088	0.086	0.092	0.092	0.092	0.070	0.072	0.069	0.076	0.000		0.004	0.013	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.016	0.016	
12	<i>E. miliaria</i> (EVACC092)	0.089	0.087	0.094	0.094	0.094	0.077	0.079	0.071	0.083	0.009	0.009		0.014	0.014	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.016	0.017	
13	<i>E. sukia</i> (SMF94578)	0.090	0.090	0.092	0.090	0.090	0.078	0.080	0.080	0.082	0.102	0.102	0.107		0.013	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.016	0.016	
14	<i>E. veraguensis</i> (SMF89877)	0.099	0.099	0.103	0.111	0.111	0.093	0.091	0.087	0.097	0.110	0.110	0.105	0.085		0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.016	0.016	
15	<i>E. fimbriatimembra</i> (SMF89857)	0.094	0.094	0.099	0.097	0.097	0.079	0.081	0.083	0.083	0.115	0.115	0.120	0.105	0.116		0.012	0.012	0.012	0.012	0.014	0.017	
16	<i>E. rabborum</i> (EVACC191)	0.100	0.100	0.104	0.102	0.102	0.091	0.093	0.095	0.097	0.121	0.121	0.126	0.109	0.120	0.082		0.000	0.000	0.000	0.014	0.015	
17	<i>E. rabborum</i> (EVACC190)	0.100	0.100	0.104	0.102	0.102	0.091	0.093	0.095	0.097	0.121	0.121	0.126	0.109	0.120	0.082	0.000		0.000	0.000	0.014	0.015	
18	<i>E. rabborum</i> (EVACC189)	0.100	0.100	0.104	0.102	0.102	0.091	0.093	0.095	0.097	0.121	0.121	0.126	0.109	0.120	0.082	0.000	0.000		0.000	0.014	0.015	
19	<i>E. rabborum</i> (EVACC195)	0.100	0.100	0.104	0.102	0.102	0.091	0.093	0.095	0.097	0.121	0.121	0.126	0.109	0.120	0.082	0.000	0.000	0.000		0.014	0.015	
20	<i>E. rabborum</i> (EVACC193)	0.100	0.100	0.104	0.102	0.102	0.091	0.093	0.095	0.097	0.121	0.121	0.126	0.109	0.120	0.082	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.015	
21	<i>E. ballarina</i> (SMF97398)	0.132	0.132	0.136	0.142	0.142	0.131	0.133	0.142	0.140	0.146	0.146	0.153	0.145	0.152	0.106	0.114	0.114	0.114	0.114		0.018	
22	<i>R. miotympanum</i> (JAC22438)	0.160	0.160	0.164	0.160	0.160	0.157	0.159	0.159	0.162	0.152	0.152	0.159	0.156	0.162	0.154	0.150	0.150	0.150	0.150	0.187		

Anexo 2. Comparación de los principales rasgos diferenciales de las especies de *Ecnomiohyla* existentes. Los datos con numeración corresponden a la siguiente literatura: ¹Mendelson *et al.*, (2015); ²Thorp *et al.*, (2021); ³Batista *et al.*, (2014); ⁴Kubicki y Salazar, (2015); ⁵Savage y Kubicki, (2010). Los datos que no incluyen numeración corresponden a información obtenida durante el desarrollo del presente trabajo.

Rasgos	<i>Ecnomiohyla sp. nov.</i>	<i>E. valancifer</i>	<i>E. echinata</i>	<i>E. minera</i>	<i>E. salvaje</i>	<i>E. bailarina</i>
LHC machos (mm)	62.8-66.8	---	58.3 ¹	72.4	79.0 ²	58.6-68 ^{3,4}
LHC hembras (mm)	66.6-78.2	64.0-87.3	58.8-69.5 ¹	53.9-71.3 ¹	84.2	57.8 ⁴
Dorso	Rugoso-granulado; débilmente tuberculado	Liso; tubérculos poco desarrollados	Liso ¹	Tuberculado; tubérculos grandes y desarrollados	Liso; tubérculos bajos y redondeados	Tuberculado ^{3,4}
Co-osificación craneal	Presente	Presente	Ausente ¹	Presente	Presente, poco desarrollado	Ausente ^{3,4}
Osteodermos craneales	Ausentes	Ausentes	Ausentes ¹	Ausentes	Ausentes	Presente ^{3,4}
Osteodermos dorsales	Ausentes	Ausentes	Ausentes ¹	Ausentes	Ausentes	Presente ^{3,4}
Proyección humeral (machos)	Presente; ancho y distalmente redondeado	Presente ¹	Ausente ¹	Presente; ancha y distalmente redondeada	Presente; prominente con forma de espina ²	Ausente ^{3,4}
Preplex (machos)	Fuertemente proyectado, redondeado y aplanado	Fuertemente proyectado, redondeado y aplanado ¹	Débilmente proyectado, de forma sub-oval ¹	Fuertemente proyectado, redondeado, no es bífido	Fuertemente proyectado, redondeado y aplanado ²	Distintivo, distalmente redondeado ^{3,4}
Excrecencias nupciales (machos)	Ausentes	Ausentes ¹	Ausentes ¹	Presentes, con forma de espinas conicas	Presentes, en grupo con forma de media luna ²	Presentes en dos grandes grupos ^{3,4}
Color en vida	Verde con manchas marrón oscuro, mancha en forma de pata con tres dedos en la superficie dorsal de la cabeza.	Verde moteado	Café rojizo pálido ¹	Verde moteado	Verde musgo con motas color verde olivo	Verde con manchas marrones ^{3,4}

Continuación del Anexo 2

Rasgos	<i>E. fimbriemembra</i>	<i>E. miliaria</i>	<i>E. phantasmagoria</i>	<i>E. rabborum</i>	<i>E. sukia</i>	<i>E. tyhysanota</i>	<i>E. veraguensis</i>
LHC machos (mm)	---	86.0-110.0 ^{3,5}	95.0 ^{3,5}	62.8-97.3 ^{3,5}	56.7-63.2 ^{3,5}	---	57.7 ³
LHC hembras (mm)	71.0-91.0 ^{3,5}	86.2 ^{3,5}	---	61.3-79.9 ^{3,5}	58.1-68.7 ^{3,5}	95.0 ^{3,5}	---
Dorso	Granulal ^{3,5}	Tuberculado ^{3,5}	Tuberculado ^{3,5}	Granulal ^{3,5}	Tuberculado ^{3,5}	Granulal ^{3,5}	Finamente tuberculado ³
Co-osificación craneal	Presente ^{3,5}	Ausente ^{3,5}	Ausente ^{3,5}	Ausente ^{3,5}	Ausente ^{3,5}	Ausente ^{3,5}	Ausente ³
Osteodermos craneales	Ausentes ^{3,5}	Presente ^{3,5}	Presente ^{3,5}	Ausentes ^{3,5}	Presente ^{3,5}	Ausente ^{3,5}	Presente ³
Osteodermos dorsales	Ausentes ^{3,5}	Presente ^{3,5}	Presente ^{3,5}	Ausentes ^{3,5}	Presente ^{3,5}	Ausente ^{3,5}	Presente ³
Proyección humeral (machos)	Ausente ^{3,5}	Ausente ^{3,5}	Ausente ^{3,5}	Presente ^{3,5}	Ausente ^{3,5}	Ausente ^{3,5}	Ausente ³
Prepox (machos)	Presente, de forma redondeada ^{3,5}	Presente, de forma recurvada ^{3,5}	Presente, de forma recurvada ^{3,5}	Presente, con extremo redondeado ^{3,5}	Presente, de forma distal obtusa ^{3,5}	---	Presente, de forma recurvada ³
Excrecencias nupciales (machos)	Presentes ^{3,5}	Ausentes ^{3,5}	Ausentes ^{3,5}	Presentes ^{3,5}	Ausente ^{3,5}	---	Presente ³
Color en vida	Café con marcas oscuras ^{3,5}	Marrón moteado y verde ^{3,5}	Marrón ⁵	Café con verde o marcas oscuras ⁵	Café a gris con verde ⁵	Verde homogéneo ^{3,5}	---