



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**“Diversidad genética de *Bufo occidentalis* como
indicador de deterioro.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

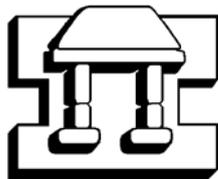
BIÓLOGO

P R E S E N T A

RAMÓN EDUARDO RIVERO ARANDA

Director De Tesis:
DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS.

2006



IZTACALA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





*El estudio es todo
lo que pueden dejar tus padres,
hay que aprovecharlo*



DEDICADO A:

Teresa y Juan; ustedes me han dado más que este título, me han dado su amor y eso no compite contra nada... los amo padres.

Sandra y Sergio por soportar y ayudar a su hermano menor, este título también es suyo, los quiero hermanos.

Hilaria y Pablo ustedes vivirán por siempre en mi corazón y en mi mente, gracias por quererme mucho abuelitos.

Moisés y Francisca; abuelitos, por ayudar en momentos difíciles a mi mamá se los agradezco.

A mis tías y tíos Librada, Efigenia, Adelina, Irma, Celso, Felipe, Juan, Faustino, Alfredo, por estar con nosotros



AGRADECIMIENTOS

Dra. *Martha Martínez Y Jorge Campos* por permitirme ingresar a su laboratorio, pero más por ser buenas personas

A mis Amigos del laboratorio de Bioquímica Molecular *Paty, Lety, Irma, Wendy, Montse, Pili, Karla, Miguel, Alex, Carlitros, Fernando y Lalo*, por ayudarme en los momentos Pcr.

Abi, Erika, Karelia, Fanny, Liz, Itzel, Marcela, Tere, Marco, Martín, Gus, Pedro, Hector, Luis, Emmanuel, Gabo, Tuca, Richard, Adolfo, por permitirme platicar con ustedes a lo largo de la carrera; pero sobre todo por ser buenas personas. A todos aquellos que ahorita no recuerdo, pero saben quienes son.

A mis otros primos por permitir convivir con ellos *Ayelen, Angelito y José*.

Claudia y Brenda por ser mis otras hermanitas, gracias por quererme.

Dany, Karlita, Vane y Karla grande, por cuidar y querer mucho a mi mamá.

Carolina (más vale tarde que nunca), gracias por ser mi amiga.

A mis Amigas *Aurora, Mariana y Paulina* chicas super poderosas gracias por aconsejarme, ayudarme y apoyarme a lo largo de la carrera.



A *Toño* por ser gran amigo, buena persona, gracias por conocerte

Al Survivor *Mac* (Israel), Al Survivor *lalo*, Al Survivor *Chos* (Juan), Al Survivor *Edsel* y Al Su... ¡Ah!, y al *Abuelo* (Alejandro)... a todos ellos muchas gracias por permitirme llevar esta gran amistad más allá de la carrera, y por ser buenos conmigo.

Marlen Juliet; Nena Bonita, eres un ser lleno de luz, que apareció para alumbrar mi camino en mi vida y me permites estar contigo. Gracias mi amor



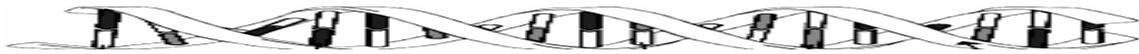
ABREVIATURAS

AMOVA	Análisis Molecular de Varianza
B	Jardín Botánico 2004
DNA	Ácido desoxirribonucleico
F_{ST}	Variabilidad genética entre poblaciones
J.B	Jardín Botánico 2003
Kb	Kilobases
m	Número de migrantes por generación
m snm	Metros sobre el nivel del mar
N_e	Número efectivo de población
N_em	Flujo génico
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RAPD	Amplificación aleatoria de fragmentos polimórficos
RFLP	Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción
T	Tilapa
UPGMA	Agrupamiento aritmético por promedios no ponderados
UV	Ultra violeta
ϕ_{ST}	Variabilidad entre las poblaciones (AMOVA)



ÍNDICE

RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
Diversidad biológica	9
Deterioro ambiental	10
Variación genética	11
Detección de la variación por marcadores moleculares	12
RAPD	14
Población	16
El género <i>Bufo</i>	17
<i>Bufo occidentalis</i>	18
ANTECEDENTES	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	26
ÁREA DE ESTUDIO	27
MÉTODOS	31
RESULTADOS	35
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	45
APÉNDICE 1	46
APÉNDICE 2	48
BIBLIOGRAFÍA	50



RESUMEN

Dentro del Valle de Tehuacán-Cuicatlán se ubica el Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla, en esta región se han identificado dos zonas contrastantes con diferentes grados de deterioro, el cual influye en el desarrollo de los ecosistemas y en la estructura poblacional de sus individuos, estos lugares son: Jardín Botánico (deteriorado) y Tilapa (conservado). *Bufo occidentalis*, especie endémica a México, forma parte de la herpetofauna del Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla, a pesar de que esta zona presenta un ambiente árido y deteriorado, esta especie se reproduce durante todo el año, su papel en el ecosistema es mantener un control natural sobre las poblaciones de algunos insectos y funciona como presa para otros organismos, su reproducción es altamente influenciada por factores bióticos y abióticos. Su complejo ciclo de vida, acuático-terrestre, hace a los anfibios susceptibles al cambio ambiental, se determinó la diversidad genética de dos poblaciones de *Bufo occidentalis*, la del Jardín Botánico y la de Tilapa; se extrajo el ADN de 54 individuos, de los cuales 19 corresponden al Jardín botánico colectados el 27 de Mayo del 2003 cabe mencionar que no se encontró ningún individuo en Tilapa en esa fecha; 16 renacuajos del Jardín Botánico y 18 de Tilapa colectados el 19 y 20 de Enero del 2004 y como individuo externo se utilizó *Bufo marinus*, utilizando la Amplificación aleatoria de fragmentos polimórficos (RAPD), se obtuvieron los diferentes parámetros genéticos para su análisis estadístico, las bandas visualizadas, se codificaron en una matriz de presencia-ausencia, que se analizó mediante el índice de Jaccard y UPGMA. La presencia de flujo génico se analizó por medio de un AMOVA. Mediante el uso de la técnica RAPD, usando 5 primers, se detectaron 70 bandas, se aplicó el índice de Jaccard y se visualizó un dendrograma con el análisis UPGMA y se obtuvo que las distancias genéticas varían en un rango, entre 0.788 y 0.447 lo cual refleja que las diferencias entre los individuos de diferentes poblaciones son altas. La N_{em} comparativa (0.6905) nos informa que el flujo génico promueve la casi similitud genética en cada población, lo que nos indica que las poblaciones no se encuentran en aislamiento. Hasta el momento, no se puede atribuir un efecto de empobrecimiento genético producto de la fragmentación en términos estadísticos, mas bien nos habla de identidad genética entre ambas poblaciones, esto es un panorama alentador, ya que habla de una población sana y que se puede hablar de la misma población, desde Tilapa hasta la población del Jardín Botánico.



INTRODUCCIÓN

Diversidad biológica.

El concepto de la diversidad biológica incluye genes, poblaciones, especies, comunidades, ecosistemas y paisajes. La diversidad funcional se refiere a la variedad de procesos e interacciones que ocurren entre los componentes biológicos. La diversidad de componentes, estructuras y procesos biológicos no constituye un mosaico estático, sino que va cambiando como resultado de procesos evolutivos y ecológicos que se manifiestan en los distintos niveles y atributos descritos para la diversidad biológica, y en múltiples escalas temporales y espaciales. La composición genética de las especies, poblaciones y comunidades biológicas, como también los tipos de ecosistema, varían a distintas tasa en el curso de la evolución (Primack *et al*, 2001).

Como la diversidad biológica se expresa en una multitud de escalas jerárquicas, es esencial especificar la escala de interés, cuando se utiliza el término diversidad biológica. Un aspecto importante cuando se estudia la diversidad biológica, es que todas las especies varían en formas, tamaños, abundancia, distribución, posición trófica, función ecológica, hábitos alimentarios, etc. Algunas especies pueden desempeñar funciones cruciales en la comunidad, así que su ausencia podría afectar significativamente a muchas otras especies. Identificar a estas especies es difícil dado que su papel puede desempeñarse temporal o estacionalmente y puede ser específico a un hábitat (Savard *et al*, 2000).



Deterioro ambiental

Los hábitat que antiguamente ocupaban grandes áreas continuas están siendo rápidamente divididos por caminos, campos de cultivo, ciudades así como otras actividades humanas. Se denomina fragmentación del hábitat al proceso en el cual un área extensa y continua del hábitat es reducida y dividida en dos o mas fragmentos. La fragmentación implica una reducción del hábitat, pero esta también puede generarse destruyendo una pequeña fracción del hábitat original si este se divide por caminos, líneas ferroviarias, canales, líneas de energía, cercas, líneas de petróleo u otras barreras al movimiento libre de especies (Primack *et al*, 2001, Zug *et al*, 2001). La fragmentación del hábitat crea barreras para los procesos de dispersión y colonización de las poblaciones, cuando un hábitat se fragmenta, muchas especies de vertebrados no podrán cruzar las distancias, aunque cortas, en áreas abiertas. Así las especies confinadas a un único fragmento son incapaces de migrar (Primack *et al*, 2001).

La remoción o modificación de la vegetación y/o suelo causa un rápido y severo impacto en algunas poblaciones de anfibios, el drenaje de las aguas, afecta a los anfibios por la remoción de los sitios de apareamiento (Ross, 1999). En México la rana *Rana tlaloci* está extinta a causa de la intervención humana (Beth, 1998), *R. pipiens* y *Acris crepitans blanchardi* son especies que se distribuyen en el oeste medio de Estados Unidos y que están en proceso de declive, los efectos antropogénicos son resultado de la pérdida de individuos y adecuación de la calidad del vida de estos anuros (Kolozsvar, 1999).

Los anfibios integran parte de las comunidades naturales, ellos funcionan como presa de varias especies de animales y de algunas plantas, consumen una gran cantidad de



invertebrados. Sin embargo, desde 1960 la biodiversidad de los anfibios está en marcado declive. Los anuros (ranas y sapos) son especialmente vulnerables a la perturbación ambiental, porque están expuestos a ambientes terrestres y acuáticos en sus diferentes estadios de vida, también es debido en gran parte a su piel permeable, haciéndolos más susceptibles que cualquier otro vertebrado a las toxinas y a los cambios en los patrones del clima (Alexander, 2000, Ross y Stephen, 1999).

Variación genética

Los individuos diploides (animales, plantas vasculares) poseen dos copias de cada gen. Si ambas copias son iguales es homocigoto; si son diferentes son heterocigotos. A nivel de la población, pueden existir múltiples formas de alelos para un gen, en cuyo caso la población es polimórfica. Si todas las copias de un gen en el conjunto de individuos de una población son idénticas, entonces la población es monomórfica. El conjunto de alelos a nivel de toda la población constituye el acervo genético. El intercambio de genes entre las poblaciones constituyen el flujo génico. Dentro de una población, la frecuencia de un alelo dado puede variar desde ser muy común a muy raro. Los nuevos alelos surgen en una población por mutación o debido a la inmigración de individuos que traen genes diferentes desde otras poblaciones (Primack *et al*, 2001)

Algunos de los factores que afectan los niveles de variación genética en las poblaciones naturales son: tamaño poblacional, endogamia, inestabilidad heterocigótica que es la oportunidad de que un par de bases mute durante la replicación, conducción meiótica, evolución del cromosoma, así como la estructura social y espacial de los individuos en su ambiente natural. Los altos niveles de variabilidad genética son vistos como saludables



confiriendo la habilidad para responder a cambios ambientales, enfermedades y depredadores; los niveles bajos de variabilidad limita a las especies a responder a estas amenazas a corto y a largo plazo. La fragmentación, casi siempre conducirá a una reducción en el tamaño poblacional y un aumento en el ritmo en el cual la variabilidad se pierde a través de deriva génica. En casos extremos, la población puede ser reducida a números muy bajos y tener pérdidas exageradas, un acontecimiento que se refiere a menudo como cuello de botella génico (Amos y Harwood, 1998). La diversidad puede ser incrementada por mutación en la población o flujo génico, este tiende a reducir las diferencias genéticas entre poblaciones locales, esta reducción, depende de las fuerzas que actúan para causar diferencias en la población. El impedimento del flujo génico de una población a otra trae como resultado una variación genética entre poblaciones aisladas. (Beth, 1998). Los cambios genéticos dentro de las poblaciones son generados por las fuerzas evolutivas tales como: mutación, deriva génica, migración y selección natural, estas mismas fuerzas son las responsables de las variaciones (aumento o disminución) en las frecuencias alélicas; y son estas variaciones de las que son cuantificadas dentro de la estructura génica, lo que permite determinar y predecir el estado actual de las poblaciones, Así se podrán hacer predicciones o reconstruir su historia evolutiva. (Amos y Harwood, 1998).

Detección de la variación por marcadores moleculares

Las estrategias clásicas para la detección de variación (anatomía, morfología, embriología y fisiología comparadas) han sido completadas o sustituidas con técnicas moleculares. Los marcadores moleculares son una serie de análisis de los constituyentes químicos y la caracterización de macromoléculas, basados en la detección de polimorfismos en proteínas



y DNA, cuyos principios se han utilizado para resolver problemas específicos en genética y ecología de poblaciones, evolución de sistemas reproductivos, mapeo genético de caracteres de interés agronómico, procesos de hibridación e introgresión, determinación de patrones biogeográficos, resolución e identificación de relaciones taxonómicas, reconstrucción de filogenias, estructura poblacional y biología de la conservación (Otero *et al*, 1997).

Se han desarrollado varios métodos como el uso de isoenzimas, o los basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés: Polimerase Chain Reaction). Desde hace dos décadas, los marcadores moleculares han permitido establecer filogenias, identidad de genes, determinación de similitud entre individuos consanguíneos y mapeo genómico de plantas y animales. Por lo tanto, el grado y tipo de variación, depende de la parte del genoma en estudio con respecto al tipo de marcador molecular (Hartl, 1999).

Las aloenzimas son proteínas de alelos del mismo locus que realizan la misma función, se realizan sin un desarrollo tecnológico extensivo y pueden ser una buena elección en términos de la información que brindan además de que el análisis es barato. Sin embargo existen razones por las cuales utilizar otro tipo de marcadores, dado que también existe una baja variabilidad en las aloenzimas y puede ser que la selección natural altere la variedad de los polimorfismos haciendo los muestreos de polimorfismos menos aleatorios (Ouborg *et al*, 1999). Los marcadores proteicos más comúnmente utilizados son las isoenzimas, que fueron los primeros marcadores moleculares usados para la estimación de variación genética, los polimorfismos son el resultado a partir de cambios en la secuencia codificante de la proteína (Hartl, 1999).



Los polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) se basan en las diferencias de fragmentos largos obtenidos de la digestión de DNA con endonucleasas denominadas enzimas de restricción, los polimorfismos son debidos a la presencia o ausencia de los sitios de restricción en el genoma de los individuos comparados. Los RFLPs se han utilizado en la elaboración de mapas genómicos, en el establecimiento de vinculación de características, el desarrollo de árboles filogenéticos y la tipificación de cromosomas. Sin embargo, la detección de RFLPs con “southern blott” es laborioso y el procedimiento requiere radioactividad. Las isoenzimas y los RFLPs tienen la ventaja de ser fenotípicamente neutrales y codominantes (Hartl, 1999).

RAPD

La versión más común de PCR es el análisis de la amplificación aleatoria de fragmentos polimórficos RAPDs (de sus siglas en inglés: Randomly Amplified Polymorphic DNA). Los RAPDs son una variación del PCR, fundamentada en el mecanismo molecular de la replicación del DNA desarrollada por Williams *et al* (1990), se basa en la acción de la enzima DNA polimerasa amplificando segmentos aleatorios del DNA molde a partir de primers con secuencias conocidas cortas de 10 nucleótidos, un solo primer funciona para la amplificación de ambas cadenas de DNA (Lynch y Milligan, 1994). Se involucra el uso de un primer arbitrario y resulta en la amplificación de varios productos discretos de DNA, cada producto va a derivar de una región del genoma que contiene dos segmentos pequeños con similitud a la secuencia del primer en segmentos opuestos, lo suficientemente cerca para su amplificación. Los productos de amplificación son separados por electroforesis en geles de agarosa y revelados con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta (Williams *et al*, 1990).



Los RAPD son relativamente sencillos de aplicar en una amplia jerarquía de taxones de animales y plantas, el número de loci que puede ser analizado es esencialmente ilimitado, se ha visto que los RAPD tienen grandes ventajas sobre los RFLP y las huellas digitales de DNA. Cuando los primers son de tamaño intermedio (en el orden de 10 pares de bases), se pueden amplificar múltiples fragmentos por genoma. Dado que los primers consisten en secuencias aleatorias y no discriminan entre regiones codificantes y no codificantes se espera que la técnica obtenga muestras del genoma más aleatorias que métodos convencionales (Lynch y Milligan, 1994). La presencia o ausencia de las bandas puede ser registrada en una base de datos como presencia-ausencia y ser convertidas en matrices de similitud para calcular distancias genéticas. (Ellsworth *et al*, 1993). Teóricamente los productos individuales representan un alelo por locus; las mutaciones que inhiben el alineamiento del primer o no hay amplificación son detectadas por la ausencia de fragmentos de DNA, la secuencia corta del primer es susceptible de identificar regiones de la cromatina que están presentes en cualquier cromosoma, debido a esto, los marcadores RAPD son dominantes porque solamente el alelo presente (+) es suficiente para permitir la amplificación por lo tanto no se puede distinguir con el análisis de estos marcadores entre el genotipo homocigoto $+/+$ del genotipo heterocigoto $+/-$ (Piepho, 2001).

Las ventajas que revelan los análisis con RAPD son: a) que no se requiere de sondas de DNA o información de las secuencias para el diseño de primers específicos, b) dado que el procedimiento no involucra pasos de hibridación ó fijado de bandas, son fáciles, simples y automatizables, y c) se requieren bajas cantidades de DNA (10 ng por reacción), d) el número de loci que pueden ser examinados es ilimitado y d) su bajo costo en comparación con microsatélites y secuencia. Es necesario mantener estrictamente constantes las



condiciones de reacción de PCR para mantener su reproducibilidad (Lynch y Milligan, 1994).

Se han detectado problemas prácticos como la presencia de bandas erróneas o artefactos, la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados y la comigración de bandas. Estas desventajas pueden disminuirse, en primer lugar, verificando que el contenido de G + C de los primers no sea mayor del 60%, evitando alineaciones del primer con segmentos que no son 100% homólogos. La reproducibilidad y confiabilidad de los resultados pueden obtenerse si se establecen de manera precisa cada una de las condiciones, tanto de la reacción de amplificación como de la electroforesis (Raboam *et al*, 1999).

Población

Una población ecológica es un grupo colectivo de organismos de la misma especie que ocupa un lugar determinado, presenta características diversas como son la densidad, natalidad, mortalidad, edad, distribución, potencial biótico, dispersión y forma de desarrollo. Las poblaciones poseen a si mismo un acervo genético en común y tienen la posibilidad de aparearse (Odum, 1972).

En la mayoría de las poblaciones estructuradas no existe el apareamiento al azar, es decir, se produce endogamia, porque algunas subpoblaciones se aparean con las más cercanas, por lo tanto la población se subdivide en grupos genéticamente más parecidos entre sí. (Hartl, 1999).



El género Bufo

El número de especies descritas para los anfibios en todo el mundo es de 5879 hasta agosto del 2005; de las 352 especies de anfibios que hay en México, 32 de ellas corresponden a la familia Bufonidae (UICN, 2005) Global Amphibian Assessment. <www.globalamphibians.org>. (18 August 2005).

El género *Bufo* es un grupo de sapos que habita en gran parte del mundo, estos son importantes en la cadena alimenticia, su papel en el ecosistema, como el de muchos anuros es mantener un control natural sobre las poblaciones de algunos insectos y funciona como alimento para gran cantidad de organismos como son aves, larvas de libélulas, peces y serpientes (Santos, 2000).

Los sapos se encuentran como habitantes nativos en la mayoría de zonas tropicales del mundo, a excepción de Australia, Madagascar y algunas pequeñas islas del pacífico; su distribución vertical alcanza desde el nivel del mar hasta una altitud de 4500 m snm. Existen unas 13 especies de sapos verdaderos del género *Bufo* en América del Norte, 81 en América del Sur y América Central, tres en Europa, 77 en Asia y 64 en África. Los sapos son fáciles de reconocer, sus pesados cuerpos con piel gruesa y sus cortas patas bastan para distinguirlos de las aerodinámicas ranas. El sapo no está conformado para moverse con rapidez; aunque, dispone de un recurso defensivo eficaz; sus glándulas parotoideas, situadas detrás de los ojos, segregan un líquido irritante cuando el animal se siente atacado. Se encuentran pequeñas glándulas granulosas situadas a lo largo de toda la epidermis segregando una pequeña cantidad del mismo líquido irritante. Esto viene a añadirse a las dificultades con que tropieza un investigador para identificar algunas especies. La



identificación depende usualmente, de aspectos generales y proporciones corporales, dichas variaciones no pueden explicarse en un lenguaje sencillo; ya que en realidad la descripción de las verdaderas afinidades de unas especies con otras requiere a menudo la utilización de un fórmula estadística. Los sapos son probablemente los más prolíficos de todos los anfibios, la hembra de *Bufo marinus* puede producir unos 35000 huevos en un año, cantidad similar por algunos otros sapos, solo un pequeño número de esos huevos llegan a crías y muy pocos llegan a la edad adulta. (Cochran, 1968).

La reproducción de los anuros puede ser controlada endógenamente pero es altamente influenciada por factores bióticos y abióticos. Su complejo ciclo de vida, acuático y terrestre hace a los anfibios muy susceptibles al cambio en cualquiera de los dos ambientes, algunos de los cuales son: en su fase terrestre compactación y desecación del suelo, reducción del hábitat; en anfibios acuáticos se exponen al incremento de cieno, drenaje, remoción de sitios de desove, trayendo como consecuencia la fragmentación poblacional, (Ross y Stephen, 1999) debido a que los anfibios son afectados en todos los aspectos por el ambiente pueden ser usados como indicador de la degradación ambiental.

Bufo occidentalis

Bufo occidentalis es una especie que se conoce desde 1878, aunque no se sabe con exactitud la fecha ni el lugar de colecta de los primeros ejemplares, con los que se realizó descripción. Esta especie ha persistido en México sin cambios taxonómicos notables, (cuadro 1) fuera de la delimitación de su área de distribución, lo que condujo a definirla como una especie endémica a México con una distribución muy amplia en diversas y variadas localidades del país (Santos, 2000).



B. occidentalis es de talla mediana (la longitud de la cloaca oscila entre los 50 y 90 mm de largo en individuos adultos). La cresta supraocular es la mas desarrollada, en organismos grandes se puede presentar una cresta postocular y una parietal. Las glándulas parotoides son medianas y ovaladas, están por detrás del borde posterior del párpado; la membrana timpánica es redonda y evidente en los organismos de talla grande. En el dorso presentan dos tipos de granulaciones casi cónicas en la punta. En los machos, inmediatamente atrás del labio ubicado en el mentón, hay un área donde los gránulos son ligeramente más grandes y separados. Presentan una coloración dorsal gris olivo claro en el fondo y sobre esta coloración se observan dos bandas paraventrales de color café oscuro que se unen a la altura del segundo tercio del dorso y delimitan una línea media vertebral irregular que se inicia en la punta del hocico. En los costados se presentan manchas irregulares pequeñas sobre el mismo fondo claro. En las extremidades se observan manchas de color café oscuro que simulan bandas transversales. La parte ventral de los muslos es de color crema (figura 1) (Woolrich, 2005).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *B. occidentalis*.

Nivel taxonómico	Taxón
Clase	Amphibia
Orden	Anura
Familia	Bufo
Género	<i>Bufo</i>
Especie	<i>Bufo occidentalis</i>
Nombre común	Sapo, Sapo de los pinos.



Fig. 1 Morfología externa de *B. occidentalis*. Tomado de www.reptilienbilder.de

El tamaño de la puesta es grande conteniendo más de diez mil huevos (figura 2). En organismos juveniles se ha observado un comportamiento mediante el cual “finge” estar muerto para evitar ser depredado; esta conducta consiste en colocarse con el vientre expuesto (dorso al suelo) y los miembros encogidos (figura 3) (Woolrich, 2005).

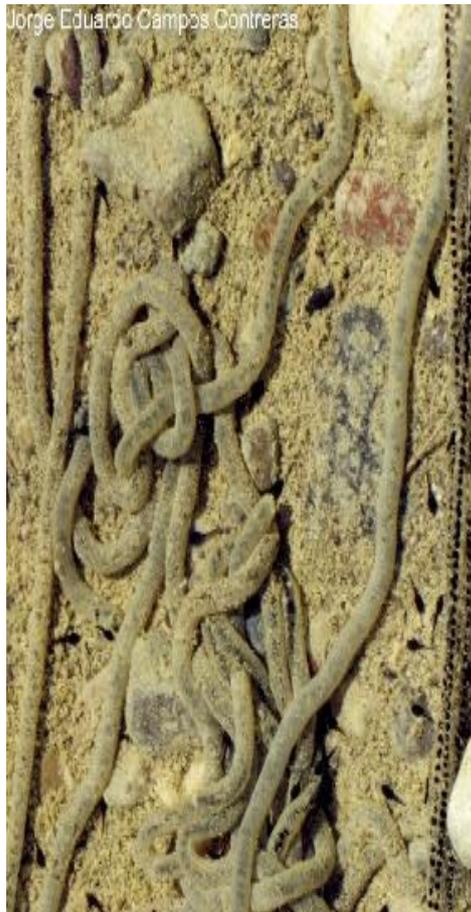


Fig. 2 Puesta de *B. occidentalis*



Fig. 3 Fingiendo estar muerto

Bufo occidentalis, se distribuye desde la meseta central mexicana, al oeste y este de Jalisco y Michoacán, al sur y noroeste de Guerrero y Oaxaca, en el centro de México, al este en la parte sur central de Puebla, Tlaxcala y Veracruz (Fig.4.), teniendo un área total de distribución aproximadamente de 263,870 km² (Woolrich, 2005).

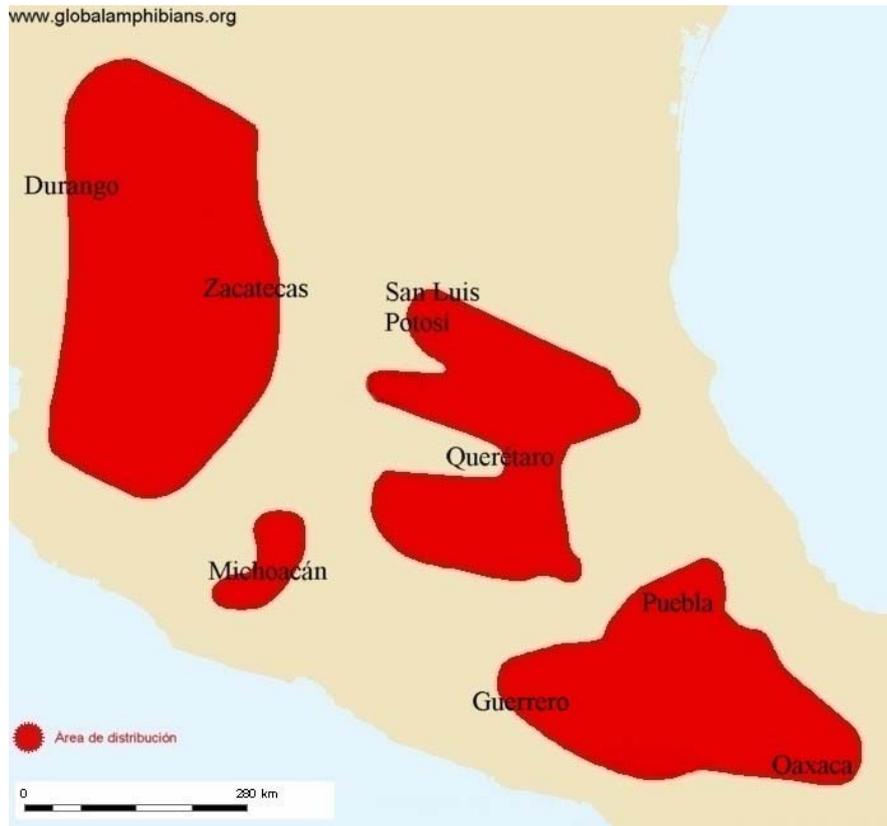


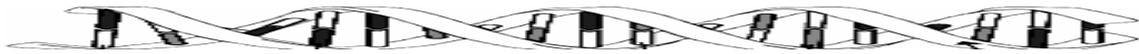
Fig. 4 Mapa de distribución de *B. occidentalis*. Tomado de www.globalamphibians.org

Santos (2000) sugiere que dentro de lo que se conoce como *B. occidentalis* existen en realidad un grupo de tres especies. Esta autora propone que la sistemática de grupos grandes de especies y de poblaciones suele ser complicada, debido a que existen especies cuya taxonomía es incompleta y los caracteres morfológicos son insuficientes. El presente estudio se realizó en Zapotitlán Salinas, Puebla, región en la que se han identificado al menos dos lugares contrastantes con diferentes grados de deterioro, el cual influye en el desarrollo de los ecosistemas y en la estructura poblacional de los individuos. UBIPRO (Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos,) 2001.



B. occidentalis, forma parte de la herpetofauna de Zapotitlán Salinas, a pesar de que esta zona presenta un ambiente árido y deteriorado, esta especie se reproduce durante todo el año (Mata, 2000). La reproducción se realiza principalmente en épocas de lluvia y es cuando se reúnen en grandes grupos junto al margen de las corrientes de agua y charcas (Woolrich, 2005).

La población de *B. occidentalis* elegida del Valle de Zapotitlán, se localiza en el afluente del Río Salado, donde llegan varias vertientes, y por ello se espera que en dos años consecutivos, presente diferencias a nivel genético debido a las condiciones de la zona; que como ya se mencionó, el deterioro del ambiente se manifiesta por la desertificación y fragmentación de los suelos y de la vegetación natural a causa de incendios, tala, forrajeo, cultivo y asentamientos humanos, así como por otros factores físicos que intervienen en la perturbación del ambiente. Para esto se deben determinar los parámetros de la diversidad genética de la población de *B. occidentalis* en el Jardín Botánico y Tilapa (las dos zonas de estudio elegidas) durante dos años, así como comparar la diversidad genética de la población de un año a otro, para tener un mayor entendimiento de los procesos de degradación en el Valle, con lo cual se pretende entender el impacto que ejercen las zonas con diferente grado de deterioro sobre la población de *B. occidentalis*. A la fecha se sabe muy poco sobre la variabilidad genética de poblaciones de anfibios considerándolos en un contexto de ambiente con diferente grado de fragmentación, pero es un hecho que como resultado de hábitat fragmentados, muchas especies son limitadas a un pequeño número de hábitat separados por zonas intermedias. Las especies con una limitada capacidad de dispersión son particularmente vulnerables a una barrera que impide el flujo génico de individuos entre las diferente zonas fragmentadas (Tallmon *et al*, 2001).



ANTECEDENTES

Como antecedentes al presente análisis se pueden citar aquellos trabajos realizados para el orden Anura dirigidos a cuantificar variabilidad genética (Cuadro 2).

Cuadro 2. Estudios realizados para diferentes especies del orden anura.

Fuente	Tipo de marcador	Especie(s)	Índices de diferenciación	Conclusión
Kim T. Scribner et al. (2001)	Tres minisatelites	<i>Bufo bufo</i>	Fst (total)=0.045	Bajo flujo génico en los 20 sitios de muestreo. Se exhibe una considerable estructura genética.
Suh-Yung Yang et. al. (2000)	Aloenzimas	<i>Kaloula borealis</i>	Fst=0.339	Los bajos niveles de diversidad en comparación de otras especies del país es debido al decrecimiento poblacional y a la distribución en parches
Perttu Seppä y Anssi Laurila (1999)	Aloenzimas	<i>Rana temporaria</i> y <i>Bufo bufo</i>	Fst= 0.068 y 0.019 Respectivamente	Altos niveles de diferencia entre las poblaciones y lo bajos niveles de variación genética son explicados por los pocos individuos que se encuentran en las islas.
Susan P. Hitchings y Trevor J. C. Beebee. (1997)	Aloenzimas	<i>Rana temporaria</i>	Fst= 0.338 en ambiente urbano y 0.145 en ambiente rural	Poblaciones urbanas exhiben alto grado de subestructuración y bajos niveles de diversidad genética a diferencia de su contraparte rural.



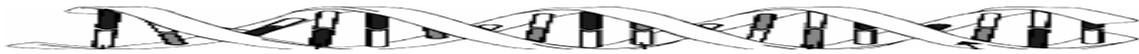
HIPÓTESIS

Debido al proceso de degradación que existe en el Valle, se pretende entender el impacto que se ejercen las dos zonas con diferente grado de deterioro sobre la población de *B. occidentalis*. Se esperan encontrar diferencias significativas en la diversidad genética de *B. occidentalis* que habita en un ambiente perturbado (Jardín Botánico) con las poblaciones encontradas en un ambiente menos perturbado (Tilapa).



OBJETIVO

Estimar el flujo génico y la diversidad genética en dos poblaciones con diferente grado de perturbación de *Bufo occidentalis* en el Valle de Zapotitlán, para conocer el impacto a nivel genético que ejercen las zonas con diferente grado de deterioro.



ÁREA DE ESTUDIO

Ubicación y caracterización

Este trabajo se realizó en el área de Zapotitlán Salinas, Puebla, que se encuentra en el Valle de Tehuacán–Cuicatlán, situado en el centro de México, El Valle se localiza en el sureste de Puebla y norte de Oaxaca ($17^{\circ}39'N$, $96^{\circ}55'W$), presenta un clima semiárido con una precipitación media anual de 400 mm y una temperatura media anual de $21^{\circ}C$ (García, 1973). La riqueza biótica que se presenta en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, puede ser explicada con base en la compleja fisiografía de la zona, el relieve accidentado determina una gran cantidad de variedad vegetal, como es la del matorral xerófilo con dominancia de cactáceas columnares (Rzedowski, 1991; Valiente-Banuet, *et al*, 2000). La flora de la región del Valle de Tehuacán-Cuicatlán está compuesta por cerca de 3000 especies de plantas vasculares, de las cuales el 30% son endémicas de la región (Dávila *et al*, 1993).

El Río Salado es el que recorre la mayor parte del Valle de Zapotitlán y es llamado así por la alta concentración de sales que contiene, además, este río es el que irriga gran parte del valle, favoreciendo la presencia de anfibios y reptiles, lo que origina un gran número de microhábitats potenciales para ser ocupados por los anfibios y reptiles (Woolrich, 2005).

De acuerdo con el grado de disturbio que presenta la zona se seleccionaron dos sitios, se debe señalar que dichos sitios son considerados los más contrastantes, cada sitio fue designado según los diagnósticos del proyecto UBIPRO (2001); el objeto de estudio es entender el proceso de deterioro ambiental en las zonas áridas. Su objetivo es analizar dicho proceso desde varias perspectivas, sentar las bases para revertirlo, lograr la restauración de



los sistemas alterados y fomentar la conservación y el manejo adecuado de los recursos naturales. Los dos sitios contrastantes son descritos a continuación.

Tilapa

Tilapa incluye los sitios donde dominan las condiciones naturales típicas, no existen evidencias claras de deterioro. Los rasgos fisiográficos están representados por una terraza aluvial típica, con relieve llano o ligeramente ondulado; los materiales geológicos (sedimentos aluviales) aún conservan sus estructuras primarias con nula o poca alteración; los suelos presentan una morfología completa, con horizontes superficiales en buenas condiciones. La vegetación muestra una estructura fisonómica bien definida, con una marcada estratificación vertical, mayor diversidad y riqueza específica; el tipo de vegetación dominante es el matorral espinoso, con asociaciones de *Prosopis laevigata* - *Cercidium praecox*, *P. laevigata* - *Myrtillocactus geometrizans*, *P. laevigata* - *Beaucarnea gracilis* y *P. laevigata* - *Neobuxbaumia tetetzo* (UBIPRO, 2001).

Jardín Botánico

El Jardín Botánico incluye aquellas áreas donde se observan los mayores niveles de deterioro que son producto, en mayor proporción, del cambio del uso del suelo. En la actualidad, son parcelas que, por la pérdida de fertilidad natural y escasa precipitación, no permiten la obtención de una producción agrícola suficiente, lo que ocasiona su abandono. El subsuelo manifiesta procesos de colapsamiento, la fragmentación de las terrazas aluviales se encuentra en su máximo nivel, es evidente la formación de pináculos creados por erosión, deslizamiento y derrumbes de grandes masas de sedimentos, formación de agrietamientos, fosas y depresiones. En esta zona el suelo original ya no existe y se



observan afloramientos de los materiales geológicos originales, en su mayor parte formados por sedimentos arcillosos derivados de lutitas y calizas. También se comienzan a manifestar cambios físicos que alteran el relieve formando montículos separados y en la época de lluvias se desarrolla una serie de canales o redes de avenamiento muy reticuladas, que favorecen el drenaje superficial pero que limita la infiltración, incrementando el proceso de deterioro físico y químico hasta formar paisajes conocidos como “Tierras Malas” (UBIPRO, 2001).

El Valle de Tehuacan-Cuicatlán, presenta un alto grado de fragmentación por lo cual este estudio pretende conocer el impacto que sufre la diversidad genética en las poblaciones de *Bufo occidentalis* en zonas con diferente grado de deterioro.

Las dos zonas de colecta son Tilapa (conservado) localizado a $18^{\circ}16'42''$ N y $97^{\circ}29'12''$ W y el Jardín botánico “Helia Bravo Hollis”, (deteriorado) que va de los $18^{\circ}19'44''$ N y $97^{\circ}27'16''$ W (Fig. 5). En cada zona se establecieron cuatro sitios de muestreo; los anfibios fueron colectados en estadio larval (renacuajos) y se depositaron en bolsas de plástico con agua de su medio, para su posterior transporte al laboratorio. La clave de identificación se muestra en el apéndice 1.

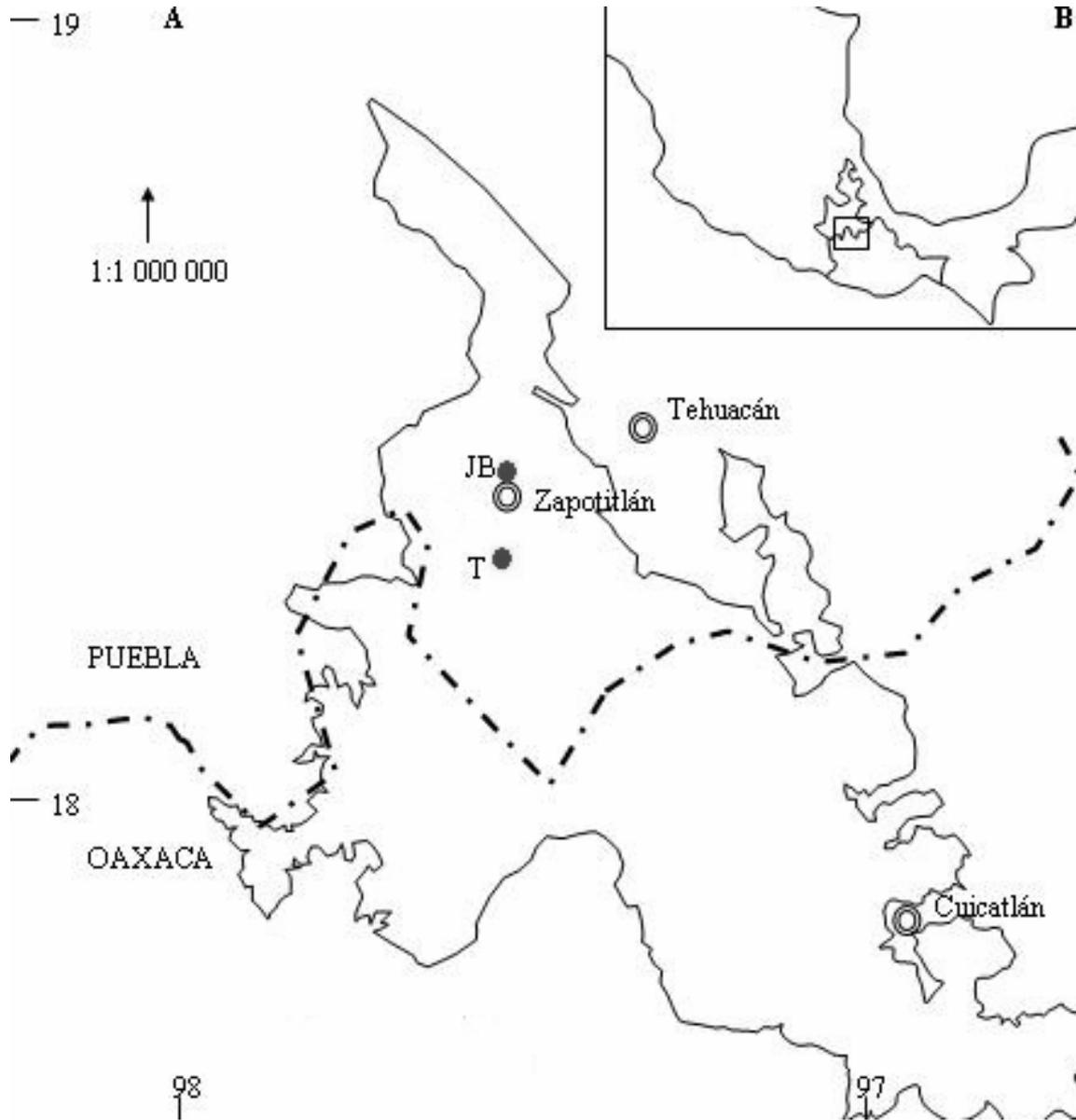
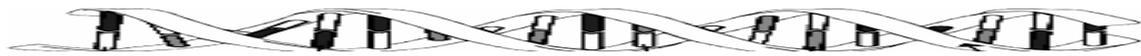


Fig. 5 Mapa del Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla, en la que se muestran los sitios de colecta. JB-Jardín Botánico. T-Tilapa.



MÉTODOS

Trabajo de laboratorio.

Se extrajo el DNA de 39 individuos, de los cuales 17 corresponden al Jardín botánico colectados el 27 de Mayo del 2003, cabe mencionar que no se encontró ningún individuo en Tilapa; 9 renacuajos del Jardín Botánico y 13 de Tilapa colectados el 19 y 20 de Enero del 2004; y como individuo externo se utilizó *Bufo marinus*. La extracción del DNA se realizó siguiendo el protocolo DNeasy tissue kit (Qiagen); El protocolo de extracción se describe en el apéndice 2.

Para comprobar la presencia del DNA genómico, se usaron 5 µl después de la extracción para correr una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, con bromuro de etidio , a 100 mV, en buffer de TBE a una concentración de 0.05X, por aproximadamente 40 min y un marcador de peso molecular de 1 Kb DNA Ladder Gibco-Brl. Los geles fueron revelados con bromuro de etidio en presencia de luz UV y fotografiados digitalmente con el programa Alfa Imager del equipo (Alfa Imager Analyzer2000, Alfa Innotech Company), con exposición UV a 1 seg y valor Gamma 2.

La reacción de amplificación para cada individuo se realizó de acuerdo a la técnica desarrollada por Williams et al. (1990) con las siguientes modificaciones realizadas por Alejos (2002). 5µl de DNA (100 a 200 ng), 11.55 µl de agua inyectable, 2.5 µl de buffer para PCR, 4 µl de nucleótidos premezclados para PCR (dNTPs) (200 µM) 0.75 µl de MgCl₂ (50mM) , 0.2 µl Taq polimerasa (5U/µl) y los primers se agregaron por separado a cada reacción, 1µl del primer (5 picomoles/µl) (Operon technologies).



La amplificación se realizó en un Termociclador GeneAMP PCR System 9700 (Applied Biosystems) programado con un ciclo previo de desnaturalización a 94°C tiempo seguido de 40 ciclos de 1 min a 94°C para la desnaturalización reversible del DNA, 1 min a 37°C para la alineación de primers y 1 min a 72°C para la polimerización y un ciclo final de 15 min. a 72°C para la polimerización complementaria. Los geles fueron visualizados con bromuro de etidio expuesto a luz UV, utilizando como referencia el marcador 1 Kb DNA Ladder Gibco-BRL en los extremos derecho e izquierdo de cada gel. Los archivos fueron fotografiados como se describió anteriormente para la cuantificación de DNA.

Análisis genéticos

Las bandas visualizadas, se codificaron en una matriz básica de datos de presencia-ausencia. En ella 1 corresponde a la aparición de una banda en un sitio determinado y 0 corresponde a una posición que no está ocupada por una banda en relación a un individuo que sí posee la banda en esa posición. Se estimó la similitud genética mediante el índice de Jaccard. Las relaciones genéticas entre los individuos fueron establecidas por el método de ligamiento promedio aritmético no ponderado (UPGMA) y visualizadas a través de un dendrograma; usando el programa NTSYSpc 2.0 en el que se observa el agrupamiento, la similitud (mas cercano a uno) y/o diferencia genética entre los individuos (mas cercano a cero). La matriz básica de datos fue transformada de acuerdo a las necesidades de cada prueba estadística.

Al analizar los datos obtenidos con RAPD's, se deben tener en cuenta dos supuestos importantes: 1) que los alelos marcados para diferentes loci no comigran a la misma



posición en el gel y 2) cada uno de los marcadores representa un locus mendeliano en el cual el marcador es visible, el alelo dominante, está en equilibrio de Hardy-Weinberg con un alelo recesivo, donde las frecuencias genotípicas siguen una distribución binomial $(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$, indicando que en una población equilibrada las frecuencias tanto de los genes como de los genotipos permanecen constantes en una población reproductiva en que los apareamientos se efectúan al azar y en donde no operan las fuerzas evolutivas que hagan cambiar las frecuencias de genes (Lynch y Milligan, 1994).

AMOVA

La presencia de flujo génico se analizó por medio de un AMOVA (Análisis molecular de varianza) (Mark P. Miller, 1998). Para calcular la variabilidad genética dentro (A) y entre las poblaciones (B) se realizó un AMOVA. Valores de A cercanos a 100% reflejan identidad de varianzas en las poblaciones, mientras que valores cercanos a 0% reflejan diferencias en las varianzas entre las poblaciones, Valores altos de B reflejan estructura poblacional y endogamia, valores altos de A reflejan poblaciones no estructuradas y alto flujo génico.

Flujo génico

Una forma de estimar la diversidad genética es considerar la diversidad fenotípica de las bandas de cada individuo como un genotipo distinto y estimar las similitudes y diferencias con base en las mismas. Bajo este supuesto a partir de la matriz de datos de presencia ausencia se estimó la estructura genética de *B. occidentalis* mediante un AMOVA.



El flujo génico se define como la transferencia de material genético entre las poblaciones como resultado del movimiento de individuos y gametos. De acuerdo al modelo propuesto por Crow y Aoki (1984) donde el equivalente multialélico de ϕ_{ST} es análogo a la F_{ST} de Wright, que es utilizado para caracterizar la estructura genética entre y dentro de las poblaciones, definiéndola como la cantidad de consanguinidad causada por las diferencias en las frecuencias génicas entre las poblaciones; es un equivalente al índice de diversidad, que es definida por la fórmula :

$$\phi_{ST} = 1 / 4 N_{em} a + 1$$

Donde $a = (n / n - 1)^2$ y n es el número de subpoblaciones. De esta fórmula puede estimarse el número efectivo de la población por generación ($N_e m$) y se da de la siguiente manera:

$$N_{em} = (1 / 4a) ([1 / \phi_{st}] - 1)$$

N_e es el número efectivo de la población, y m el número de emigrantes por generación.

El producto de estos dos últimos representa el flujo génico. Este valor es inversamente proporcional a la de ϕ_{st} y si $N_e m$ es mayor a 1 existe flujo génico en la especie.



RESULTADOS

Extracción de DNA

Con el protocolo de extracción Dneasy tissue kit (Qiagen); se obtuvieron altas cantidades de DNA de buena calidad en todos los individuos (Figura 6). El DNA obtenido se diluyó con agua hasta obtener un patrón de bandeo similar a los individuos B1, B2, B4, B5 (figura 7). Así fue utilizado para la amplificación RAPD.

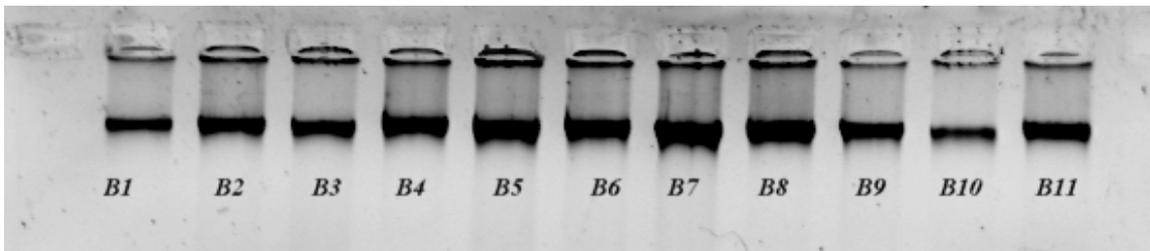


Fig. 6 Extracción de DNA. Gel revelado con bromuro de etidio y capturado digitalmente. DNA muy concentrado.

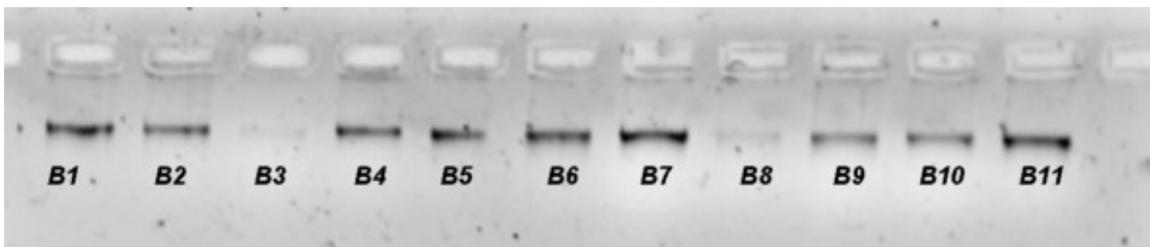


Fig. 7 Dilución de DNA. Gel revelado con bromuro de etidio y capturado digitalmente. Los individuos B3 y B8 se volvieron a diluir hasta tener un patrón similar a los demás.



Matriz básica de datos

Fueron ensayados 14 primers con los cuales se realizaron las pruebas de amplificación para todos los individuos, de ellos se eligieron cinco (cuadro 3) los cuales fueron seleccionados por su reproducibilidad y debido a que produjeron un número considerable de bandas polimórficas (fig. 8). Fueron incluidas en el análisis todas las bandas producto de la amplificación RAPD. Las bandas oscilaron entre 1808 pb y 222 pb; estas fueron producto de la amplificación de los primers E14 y C07 respectivamente.

Cuadro 3. Nombre, Secuencia de los primers utilizados y el número de marcadores obtenidos.

Primer	5' secuencia 3'	Marcadores
A04	AATCGGGCTG	10
A02	TGCCGAGCTG	14
C08	TGGACCGGTG	16
E14	TGCGGCTGAG	17
C07	GTCCCGACGA	18
<i>Total</i>		<i>75</i>

Se obtuvo una matriz básica de datos de 75 bandas (marcadores) por 39 individuos, que incluye a las poblaciones del Jardín Botánico y Tilapa. Fueron tomadas como polimórficas a todas las bandas en las que se tuvieran los dos estados de carácter (1, 0), sin importar el número de individuos en los que se presentara, teniendo cuidado de verificar el patrón de bandeo de todos los individuos y en especial de aquellos en los que las bandas son exclusivas.

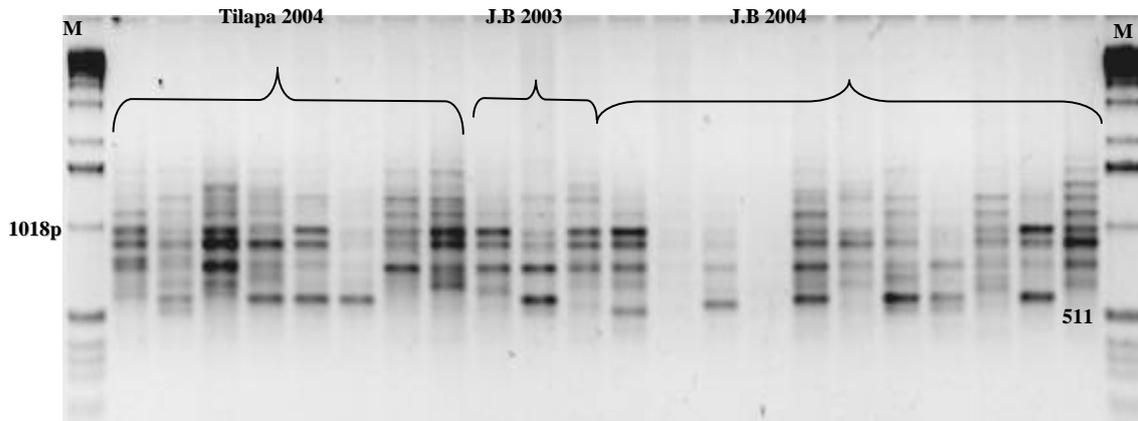


Fig. 8. Ejemplo de polimorfismos evidenciados por los diferente primers, en esta figura se presenta el primer C08 en las dos zonas de muestreo. M-Marcador de peso molecular (1Kb).

Indice de similitud

El análisis comparativo con el índice de similitud de Jaccard y agrupado con el programa UPGMA (Figura 9), se obtuvo que las distancias genéticas varían en un rango, entre 0.788 y 0.447 lo cual refleja que las diferencias entre los individuos de diferentes poblaciones son altas. El índice de correlación del árbol producto de la prueba de Mantel (r) fue de 0.794 (1000 permutaciones), lo cual es un valor bueno. De acuerdo al patrón de agrupamiento se puede notar que los individuos de las dos zonas de colecta se agrupan de forma heterogénea, no hay una separación de individuos, ya sea por zonas o por fecha de colecta.

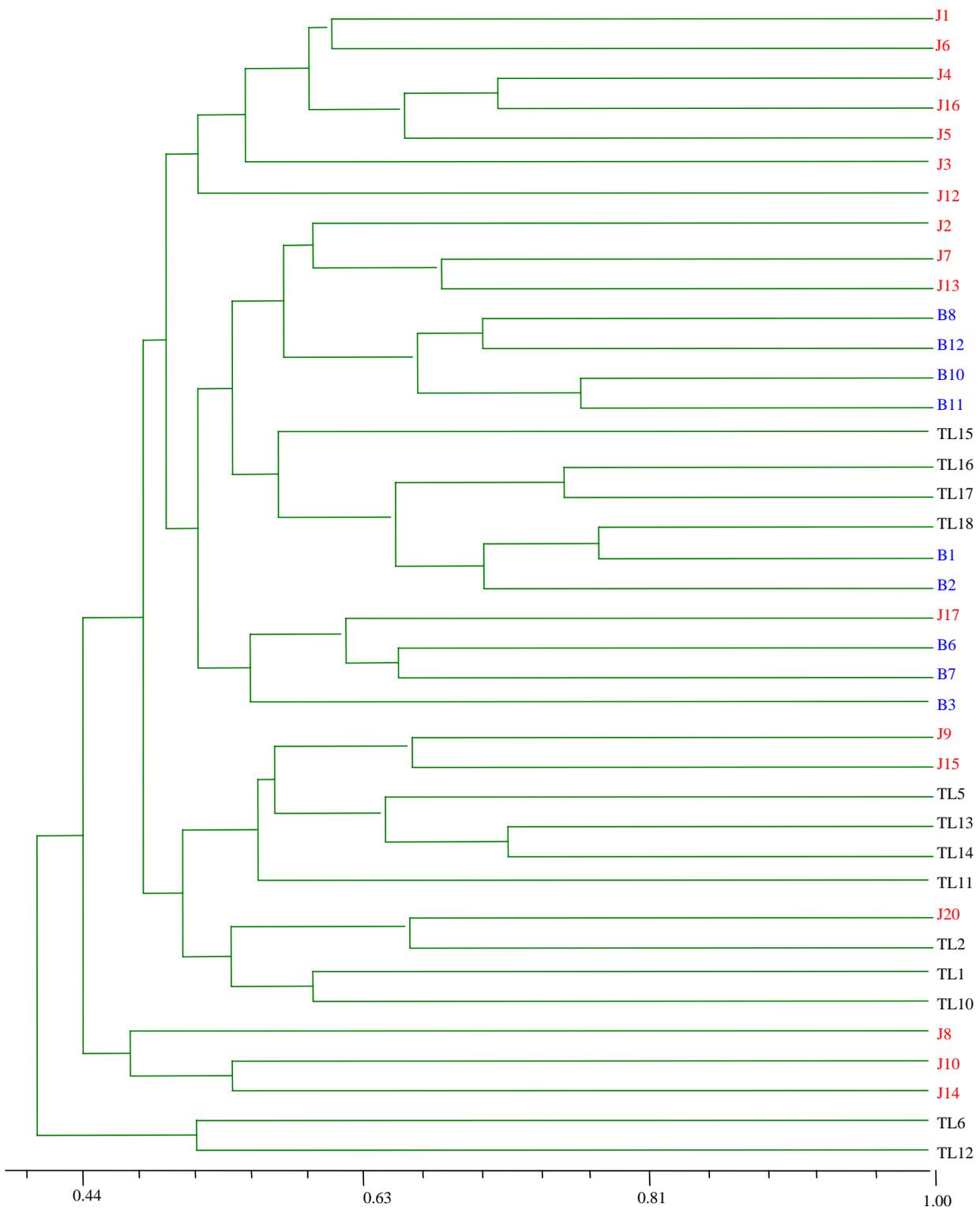


Fig. 9. Dendrograma obtenido con UPGMA, en la que se muestra a todos los individuos de las dos zonas y los dos años de colecta.



AMOVA

Se detectó que existe un mayor porcentaje de la variación genética dentro de las poblaciones que entre las poblaciones, con el AMOVA (cuadro 4) el grado de confiabilidad fue de $P < 0.001$. y se muestra que el 91.68% de la variación total se encuentra dentro de la misma población, en las dos fechas de colecta realizadas, y solo el 8.32% está dada entre las poblaciones. Esto indica que no existe una estructura génica en el espacio y tiempo en las poblaciones, es importante señalar que en este documento se entiende por población a los individuos colectados en un sitio y en una misma fecha.

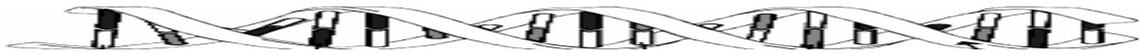
Cuadro 4. Resultados de AMOVA para 54 individuos de *B. occidentalis* agrupados dentro de las dos poblaciones estudiadas y en diferentes fechas de colecta

PARÁMETROS DE VARIACIÓN	% VARIACIÓN	ϕ_{ST}	P
Tilapa2004-Jardín Botánico 2003- Jardín Botánico 2004			
(A) Entre poblaciones	8.32%	0.083	< ó = 0.001
(B) Dentro de las poblaciones	91.68%		

Donde P= Probabilidad de que los productos sean al azar después de 1000 permutaciones.

Flujo Génico

Para evaluar el flujo génico, fueron utilizados los datos pareados de la ϕ_{ST} producto del AMOVA, utilizado la fórmula basado en la relación de Crow y Auki (1984), y se obtuvo lo siguiente 0.6905 lo que indica que si se percibe flujo génico de un año a otro.



DISCUSIÓN

Los estudios de diversidad genética reflejan la estructura poblacional o sea la cantidad y distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones, estos influyen en los mecanismos de divergencia y especiación, y sirven para entender la evolución y conocer el estatus de conservación de las especies; así mismo es que los estudios de diversidad genética acerca de una especie toman una dimensión mayor al conocer la importancia que tiene la misma para el ecosistema (Primack *et al*, 2001) es por esto que al conocer la variabilidad y saber cuál es el efecto en dos sitios contrastantes con diferente grado de perturbación ha afectado de manera notable a la especie, permitiendo establecer si la especie puede considerarse como indicadora de esta perturbación.

El presente estudio tuvo como fin evaluar cuál es el efecto sobre la diversidad genética en dos zonas con diferentes características, una perturbada (Jardín Botánico) y la otra conservada (Tilapa), es importante saber el efecto del ambiente sobre la población de *B. occidentalis*. Como se ha mencionado la perturbación y fragmentación ambiental, a largo plazo genera empobrecimiento genético por la reducción de la población y en casos extremos la extinción de las especies, por su vulnerabilidad a la endogamia y deriva génica (Primack *et al*, 2001), (Hitchings *et al*, 1997).

El análisis de AMOVA nos muestra como se distribuye la diversidad dentro y entre las poblaciones, detectándose que la mayor variación genética se encuentra dentro de las poblaciones que entre las poblaciones. El impacto en la modificación del hábitat en la diversidad genética de *B. occidentalis* es rápido y superficialmente indetectable a nivel



fenotípico, *B. occidentalis* aparentemente está entrelazado en las dos zonas de estudio, ya que es abundante en los márgenes del río; aunque la variación es mínima interpoblacionalmente 8.32% y elevada intrapoblacionalmente 91.68% como lo demostró el porcentaje de variación obtenido por el AMOVA.

El agrupamiento por distancias genéticas, evaluadas por el índice de similitud de Jaccard, sugiere que las distancias genéticas entre los individuos son altas y varían en rangos entre 0.788 y 0.447, lo cual habla de un amplio rango de similitud en las distancias. A pesar de esto, el agrupamiento tiene una $r = 0.79439$ probablemente es por ésta condición que el agrupamiento, y la disimilitud entre los individuos se pueden establecer en un valor confiable de la relación. Para la población, el agrupamiento refleja variabilidad, aunque es de notarse que a pesar que las distancias sean altas, algunos individuos sobretodo los del Jardín Botánico 2003 se agrupan en el mismo brazo del dendograma, sin embargo los demás individuos se encuentran distribuidos a lo largo del dendograma. No se han detectado efectos de la fragmentación sobre la variabilidad genética.

Hasta el momento, no se puede atribuir un efecto de empobrecimiento genético producto de la fragmentación en términos estadísticos, mas bien nos habla de identidad genética entre ambas poblaciones, esto es un panorama alentador, ya que habla de una población sana y que se puede hablar de la misma población, desde Tilapa hasta la población del Jardín Botánico. Tratar de tomar al agrupamiento en el mismo brazo de los individuos para la subdivisión de ambas poblaciones, al efecto del deterioro ambiental, sería una decisión arbitraria, pero estaría encaminada a detectar la formación de subdivisiones para una población en términos genéticos.



Como se observa en el dendrograma, los individuos del Jardín Botánico 2003 están ligados entre si y con los del Jardín Botánico 2004. Por lo tanto no hay una relación geográfica aparente con los individuos de Tilapa; entonces es necesario recurrir a una explicación alternativa para entender la similitud morfológica de poblaciones de la misma especie en la misma región; tal vez la estructuración de las poblaciones de *B. occidentalis* sea el producto de una combinación de fluctuaciones naturales y sea difícil distinguir entre declinaciones causadas por humanos y las causadas por interrupciones naturales, sin embargo, se tienen diversos estudios en la zona a nivel físico, ecológico y funcional que pueden avalar estos resultados.

La subdivisión en posibles subgrupos debe tomarse en cuenta de cómo puede afectar la variabilidad genética en la subdivisión de poblaciones dentro de un ambiente natural.

El cuadro 5 muestra algunas comparaciones de ϕ_{ST} en varias especies de anuros. La estimación de la variabilidad genética en la población de *B. occidentalis* de 0.083, estos valores son bajos en comparación a los del cuadro 5, estos datos posiblemente son dados a la distancia de las colectas que manejé 8 km de distancia, los datos del cuadro son distancias que oscilan entre los 40 y 100 km. La variación genética es típica y común en muchas especies de anuros debido al aislamiento o fragmentación ambiental, la baja variabilidad es debido a la poca conectividad poblacional y a la fragmentación de las áreas en que se encuentran (Hitchings, 1997).



Cuadro 5. Comparación de la diversidad genética de algunos anuros. Modificado de Hitchings (1997).

Espece	ϕ_{ST}
<i>Bufo japonicus</i>	0.244
<i>Rana spp.</i>	0.289
<i>Rana temporaria</i>	0.324
<i>Bufo bufo</i>	0.487
<i>Bufo occidentalis</i>	0.112 y 0.209

La N_{em} comparativa (0.6905) nos informa que el flujo génico promueve la casi similitud genética en cada población, lo que nos indica que las poblaciones no se encuentran en aislamiento.

Las poblaciones de Tilapa y del Jardín Botánico todavía son parte de una población; sin embargo el deterioro y la fragmentación ha sido tan reciente que el tiempo no ha sido suficiente para diferenciarlas genéticamente; pero la evaluación de flujo génico, nos muestra que este está dejando de existir entre las poblaciones y es posiblemente debido a el resultado de la distribución aislada de esta especie en la misma zona; y si no hay apareamiento en toda la distribución de las dos poblaciones puede llevar a la endogamia, tal y como está sucediendo en la población de *Kaloua boreales* que es una rana de Korea cuya distribución es en parches, después de la destrucción y contaminación de su hábitat natural,



afectando el flujo génico en esta especie provocando una disminución del tamaño poblacional y a su distribución en parches (Suh-yung *et al*, 2000).

Para evaluar totalmente a la especie, es necesario extender los estudios de variabilidad genética a todo el Valle de Zapotitlán Salinas, combinados con la distribución geográfica de la especie y así poder llevar la potencial dirección de esta especie como un bioindicador en esta zona.



CONCLUSIONES

- Se observó una ligera diferencia entre la diversidad genética de las poblaciones analizadas, siendo la población de la zona mas deteriorada (Jardín Botánico) la más diversa genéticamente.
- Dado que el análisis pudo separar eficientemente a las dos poblaciones por el grado de perturbación a nivel genético, la diferencia entre los índices de diversidad genética, aunque ligeramente diferentes, fueron significativos, lo que permite encaminar a esta especie como un posible indicador del grado de deterioro.



APENDICE 1

Claves De Identificación Para *Bufo occidentalis* En El Valle De Zapotitlán Salinas, Puebla.

Clave 2 Orden Anura

1^a Con una prominente y conspicua glándula (glándula parótida) detrás de cada ojo (figura 1). Cuerpo verrugoso y de consistencia granular; manchas dorsales verdosas y marrones en la parte dorsal, sobre un fondo amarillento, verde claro o parduzco. Sapos que habitan cerca de cuerpos de agua permanentes ----- *Bufo occidentalis*

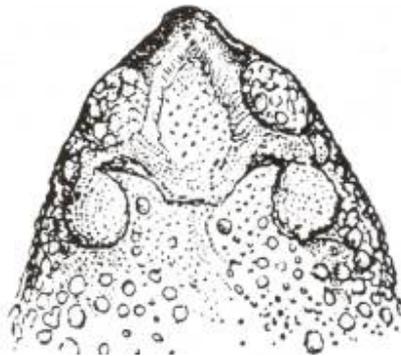


Fig. 1 Glándulas parótidas en el género *Bufo*.

Clave 3. Orden Anura (Renacuajos de Ranas y Sapos).

2A Papilas labiales incompletas alrededor del disco oral, con un hueco superior y/o un hueco inferior; filas de dientes labiales con separaciones en la parte media (principalmente en la fila A2) ----- **2**

2A Papilas labiales con un hueco superior y un hueco inferior; con emarginaciones laterales. Disposición de las filas de dientes labiales 2/3 ; fila A2 con separación media muy



pequeña. Filas de dientes labiales inferiores de la misma longitud (P1 = P2 = P3). Rara vez se presenta una separación pequeña en P1 o P2 (Fig. 9). Coloración del cuerpo variable, desde un color oscuro uniforme (principalmente en estadios inferiores a 28*), hasta tonalidades y matices dorados sobre fondos verdosos (principalmente en estadios mayores a 26*) ----- ***Bufo occidentalis***.

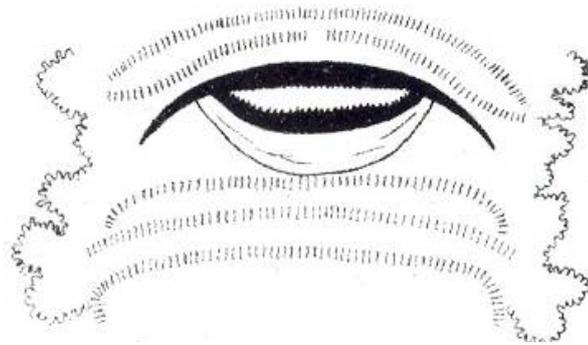


Fig. 9 *Bufo occidentalis*

* Estadios o etapas larvarias según las claves de Gosner (1960).

Tomado de Wolrich, 2005



APÉNDICE 2

Extracción De DNA Por El Método Dneasy Tissue Kit (QIAGEN). Modificado.

- 1.- Cortar 25mg de tejido (10mg si es bazo) en piezas pequeñas y colocar en un tubo de microcentrífuga (eppendorf) de 1.5ml, y agregar 180µl de buffer ATL.

- 2.- Añadir 20µl de proteinasa K, agitar e incubar a 55°C en un thermomixer 5436 hasta que el tejido esta lisado.

- 3.- Vortezar por 15 seg. añadir 200µl de buffer AL (ya disuelto con etanol) a la muestra, mezclar por vortex e incubar a 70°C durante 10min en el thermomixer 5436.

- 4.- Pipetear la mezcla del paso 3 dentro de la columna del DNeasy, la columna está provista de un tubo colector de 2ml (provisto). Centrifugar a 8000rpm (centrifuga Hermle Z 200 M/H) por un minuto. descartar el fluido y conservar la columna.

- 5.- Poner la columna del paso 4 en un nuevo tubo colector de 2ml y añadir 500µl de buffer AW1, centrifugar por 1min. a 8000rpm. descartar el fluido y conservar la columna.

- 6.- Poner la columna del paso 5 en un nuevo tubo colector de 2ml, añadir 500µl de buffer AW2, y centrifugar por 3 min. a máxima velocidad (14000rpm). Descartar el fluido y conservar la columna.



7.- Colocar la DNeasy columna en un tubo limpio de microcentrífuga (eppendorf) de 1.5ml ó 2ml y pipetear 200µl de buffer AE directamente en la membrana de la columna. Incubar a temperatura ambiente por 1min. y centrifugar por un minuto a 8000rpm.

8.- Repetir lo descrito en el paso 7 (en lugar de usar 200µl de buffer AE se agregaron 150µl).



BIBLIOGRAFÍA

- Alejos LP. 2002. Estudio de la estructura poblacional de *Neobuxhamia macrocephala* en Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, mediante el uso de marcadores moleculares. Tesis de licenciatura. FES-Iztacala UNAM. México.
- Alexander AM, Eischeid JK. 2000. Climate variability in regions of amphibian declines. *Conservation Biology*. 15: 930-942.
- Amos W, Harwood J. 1998. Factors affecting genetic diversity in natural populations. *Phil.Trans. Royal. Society of London B*. 353: 177-186.
- Beth GL. 1998. The use of heterologous primers to amplify microsatellite loci in the genus *bufo*. Tesis de maestría. Boston College. Canada.
- Cochran DM. 1968. Los anfibios. Tercera edición. *Editorial Seix Barrad, S. A.* Barcelona, España.
- Crow JF, Aoki k. 1984. Group selection for a polygenic behavioral trait: Estimating the degree of population subdivision. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. 81: 6073-6077.
- Dávila APD, Villaseñor RJL, Medina LR, Salinas TA, Sánchez KJ, Tenorio LP. 1993. Listado florístico de Mexico X. Flora del Valle de Tehuacan Cuicatlán. Departamento de Botánica. Instituto de Biología, UNAM. Méx.
- Ellsworth DL, Rittenhouse KD, Honeycut RL. 1993. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *Biotechniques*. 14: 214-217.
- García E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía UNAM, México.



- Hartl DL. 1999. A primer of population genetics. *Sinauer, Sunderland, Massachusetts*. Tercera edición. USA.
- Hitchings SP, Beebee TJC. 1997. Genetic substructuring as a result of barriers to gene flow in urban *Rana temporaria* (common frog) populations: implications for biodiversity conservation. *Heredity*. 79: 117-127.
- Karp A, Buiatti M. 1996. Molecular techniques in the assesment of botanical Diversity. *Annals of Botany*. 78: 143-149.
- Koloszvary MB, Swihart RK. 1999. Habitat fragmentation and the distribution of amphibians: patch and landscape correlates in farmland. *Canadian Journal of Zoology*. 77: 1288-1299.
- Landa RJM, Carabias J. 1997. Enviromental deterioration in rural Mexico: an Examination of the concept. *Ecological Applications*. 7: 316- 329.
- Lynch M, Milligan BG. 1994. Analisis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*. 3: 91-99.
- Mata SV. 2000. Estudio comparativo del ensamble de anfibios y reptiles en tres localidades de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Tesis de licenciatura. FES-Iztacala UNAM. México.
- Odum EP. 1972. Ecología. *Nueva Editorial Interamericana*. Tercera Edición. México D.F.
- Otero AA, De la Cruz M, Oyama K. 1997. El uso de los RAPDs como marcadores moleculares. *Soc. Bot. México*. 60: 85-117.
- Ouborg NJ, Piquot Y, Van Groenendael JM. 1999. Population genetics, molecular



Markers and the study of dispersal in plants. *Journal of Ecology*. 87: 551-568.

- Piepho HP. 2001. Exploiting quantitative information in the analysis of dominant markers. *Theoretical & Applied Genetics*. 103: 462-468.
- Perttu S, Anssi L. 1999. Genetic structure of island populations of the anurans *Rana temporaria* and *Bufo bufo*. *Heredity*. 82: 309-317.
- Primack R, Rozzi R, Feinsinger P, Dirzo R, Massardo F. 2001. Fundamentos de conservación biológica perspectivas latinoamericanas. *Fondo de Cultura Económica*. México.
- Raboam, C, Comes AM, Bretagnolle V, Humbert FJ, Periquets G, Bigots Y. 1999. Features on DNA fragments obtained by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays. *Molecular Ecology*. 8: 493-503.
- Rzedowski J. 1991. Vegetación de México. *Limusa*. México, D.F.
- Ross AA, Stephen JR. 1999. Global Amphibians declines: A problem in applied ecology. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 30: 133-65.
- Santos BG. 2000. Sistemática de *Bufo occidentalis*. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Savard JL, Clergeau P, Mennechez G. 2000. Biodiversity concepts and urban ecosystems. *Landscape and Urban Planning*. 48: 131-142.
- Suh-YY, Jong-BK, Mi-SM, Jae-HS, Young-JK. 2000. Genetic diversity and population structure of *Kaloula borealis* (Anura, Microhylidae) in Korea. *Korean J. Biol. Sci.* 4: 39-44.



- Tallmon DA, Draheim HM, Scott M, Allendorf WF. 2001. Insights into recently fragmented vole populations from combined genetic and demographic data. *Molecular Ecology*. 11: 699-709.
- Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos (UBIPRO). Julio 2001. Evaluación del Deterioro Ambiental, Restauración, Conservación Ecológica y Manejo Sustentable de Recursos Naturales en la Subcuenca Baja de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. *FES-Iztacala, UNAM*. México.
- Valiente-Banuet A, Casas A, Alcántara A, Dávila P, Arizmendi AMC, Villaseñor JL, Ortega J. 2000. La vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Bol. Soc. Bot. México*. 67: 24-74.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18: 6531-6535.
- Wolrich PG, Oliver LL, Lemos EJ. 2005. Anfibios y Reptiles del Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla. *UNAM. México*.
- Zug RG, Vitt JL, Caldwell PJ. 2001. Herpetology an introductory biology of amphibians and reptiles. *Academic press*. USA.
- <http://www.reptilienbilder.de/>
- <http://www.globalamphibians.org/servlet/GAA?searchName=Bufo+occidentalis>