



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Bases genéticas para la diferenciación de *Dryophytes arboricola* de  
*D. eximius* (Anura: Hylidae), evidencia mas allá del canto**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA  
P R E S E N T A :**

**PAULINA FERNÁNDEZ SÁNCHEZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
Dr. VÍCTOR HUGO REYNOSO ROSALES  
CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, 2018**



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.

1. Datos del alumno

Fernández

Sánchez

Paulina

Universidad Nacional Autónoma de México

México

Facultad de Ciencias

Biología

309040314

2. Datos del tutor

Dr.

Víctor Hugo

Reynoso

Rosales

3. Datos sinodal 1

Dr.

Marco Alejandro

Suárez

Atilano

4. Datos sinodal 2

M. en C.

Enrique

Scheinvar

Gottdiener

5. Datos sinodal 3

M. en C.

Andrea Rubí

Jiménez

Marín

6. Datos sinodal 4

M. en C.

Ricardo Canek

Rivera

Arroyo

7. Datos del trabajo escrito

Bases genéticas para la diferenciación de *Dryophytes arboricola* de *D. eximius* (Anura Hylidae), evidencia mas allá del canto.

72 páginas

2018

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Víctor Hugo Reynoso por el apoyo y tiempo ofrecido, y principalmente por ofrecerme el proyecto y darme una segunda oportunidad. Gracias por confiar en mí.

Al M. en C. Canek Rivera por la enseñanza de todos los métodos moleculares en el laboratorio, los métodos para el análisis de datos y toda la paciencia necesaria para contestar mis dudas. Porque nunca se rindió y me ayudó hasta el final.

A la M. en C. Andrea Jiménez por toda la ayuda en el Laboratorio, por su tiempo para resolver mis dudas y por el préstamo de reactivos y herramientas. Que sin su ayuda hubiera sido más larga mi agonía purificando mis muestras.

A la Q. F. B. Schehrezada Monserrat Cruz Arroyo por la ayuda en el diseño de primers para dos genes mitocondriales. Muchas gracias.

A la Bióloga Adriana González Hernández por su ayuda en la identificación y confirmación de los ejemplares, por el préstamo de material y porque siempre está ahí para uno. Gracias Adri.

Al Biólogo Aldo Carrillo por brindarme las muestras necesarias para llevar a cabo este trabajo. Muchas gracias.

Al Dr. Marco Suárez por toda la ayuda brindada en todos los momentos, resolver mis dudas y aceptar ser parte de mi jurado. Gracias

Al M. en C. Enrique Scheinvar por contagiarme el gusto por la genética de poblaciones, ser un excelente profesor y nunca cansarse de contestar mis dudas. Muchas gracias por aceptar ser parte de mi jurado.

Al Ing. Agrícola Saúl Diez de Sollano, por la ayuda en las salidas de campo a la población de Álvarez, S. L. P., gracias por capturar todas las ranas y hacer de esas salidas una hermosa experiencia. Gracias por confiar en mí y siempre estar ahí. Te amo.

A la Bióloga Corina Rodríguez, por su ayuda y elaboración en los mapas de colecta de mis ranas. Muchas gracias por tu amistad Coris.

A mi familia por el apoyo y comprensión en todos los aspectos. Gracias por estar ahí siempre.

A todas las personas que me brindaron su amistad, apoyo y consejos en el proceso. Muchas gracias.

Agradezco el apoyo del Instituto de Biología de la UNAM y al Buró de Investigaciones y Soluciones Biológicas, A. C. (ISBio) por el financiamiento al proyecto.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN .....	2
1.1 Cantos en anuros .....	2
1.2 El género <i>Dryophytes</i> .....	2
1.3 Grupo <i>Dryophytes eximius</i> .....	3
1.4 <i>Dryophytes arboricola</i> y <i>D. eximius</i> .....	4
II. ANTECEDENTES .....	10
2.1 Concepto de especie y límite de especies.....	10
2.2 Genética y estructura poblacional .....	11
2.3 ADN mitocondrial.....	13
III. OBJETIVOS.....	14
3.1 Objetivo general .....	14
3.2 Objetivos particulares.....	14
IV. JUSTIFICACIÓN .....	15
V. HIPÓTESIS .....	15
VI. PREDICCIONES .....	15
VII. MATERIALES Y MÉTODO .....	16
7.1 Área de estudio.....	16
7.2 Trabajo de campo .....	17
7.2.1 <i>Obtención de ejemplares</i> .....	17
7.3 Trabajo de laboratorio .....	18
7.3.1 <i>Extracción de ADN</i> .....	18
7.3.2 <i>Visualización de ADN</i> .....	18
7.3.3 <i>Diseño y elección de primers</i> .....	18
7.3.4 <i>Gradientes de temperatura</i> .....	19
7.3.5 <i>Amplificación de genes</i> .....	20
7.3.6 <i>Purificación de las muestras</i> .....	21
7.3.7 <i>Secuenciación</i> .....	21
7.4 Análisis de datos.....	22
7.4.1 <i>Edición de secuencias</i> .....	22
7.4.2 <i>Alineamiento de secuencias</i> .....	22

7.5 Análisis para la diferenciación entre poblaciones .....	22
7.5.1 <i>Diversidad genética</i> .....	22
7.5.2 <i>Estructura genética</i> .....	23
7.5.3 <i>Variación intra e inter poblacional</i> .....	24
7.6 Análisis para establecer las relaciones entre poblaciones .....	24
7.6.1 <i>Redes de haplotipos</i> .....	24
7.6.2 <i>Inferencia filogenética</i> .....	24
7.6.3 <i>Distancias genéticas entre clados</i> .....	25
7.6.4 <i>Red con Dryophytes arboricola</i> .....	25
VIII. RESULTADOS .....	26
8.1 <i>Diversidad genética</i> .....	26
8.2 <i>Estructura genética</i> .....	28
8.3 <i>Variación intra e inter poblacional</i> .....	29
8.4 <i>Redes de haplotipos</i> .....	30
8.5 <i>Inferencia filogenética</i> .....	35
8.6 <i>Distancias genéticas entre clados</i> .....	44
8.7 <i>Red con Dryophytes arboricola</i> .....	44
IX. DISCUSIÓN .....	46
9.1 <i>Diversidad genética de Dryophytes arboricola y D. eximius</i> .....	46
9.2 <i>Estructura y variación entre las poblaciones de Dryophytes arboricola y D. eximius</i> .....	47
9.3 <i>Inferencia filogenética entre Dryophytes arboricola y D. eximius</i> .....	48
9.4 <i>Distancias genéticas entre las poblaciones de D. arboricola y D. eximius</i> .....	50
9.5 <i>Dryophytes arboricola y D. eximius</i> .....	51
9.6 <i>Cantos de Dryophytes arboricola y D. eximius</i> .....	52
9.7 <i>¿Es Dryophytes arboricola una especie diferente a D. eximius?</i> .....	54
X. CONCLUSIONES.....	56
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	57
XII. ANEXOS .....	66
ANEXO I.....	66
ANEXO II .....	67
ANEXO III.....	68
ANEXO IV.....	68

### ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Filogenia de las ranas del género <i>Dryophytes</i> . .....	4
Figura 2. Distribución potencial de <i>Dryophytes arboricola</i> y <i>D. eximius</i> . .....	5
Figura 3. <i>Dryophytes arboricola</i> y <i>D. eximius</i> . .....	6
Figura 4 Estructura filogeográfica dentro de uno de los clados del grupo <i>D. eximius</i> . .....	7
Figura 5. Reconstrucción de árbol de especies del grupo <i>D. eximius</i> . .....	8
Figura 6. Distancias geográficas entre las localidades de colecta de <i>Dryophytes arboricola</i> y <i>D. eximius</i> . .....	17
Figura 7. Ejemplares de <i>D. eximius</i> de la población de Álvarez etiquetados con su IBH. ....	18
Figura 8. Foto de las extracciones de ADN de la población de Álvarez. ....	19
Figura 9. Gradiente de temperatura para <i>Cyt b</i> . .....	20
Figura 10. Protocolo de las amplificaciones por medio de PCR. ....	21
Figura 11. Sección de un cromatograma de la secuencia F de AL04 para ND4. ....	22
Figura 12. Estructura genética de cuatro poblaciones de <i>Dryophytes arboricola</i> y <i>D. eximius</i> . ....	29
Figura 13. Red de haplotipos para el gen ND4. ....	31
Figura 14. Red de haplotipos para el gen <i>Cyt b</i> . .....	32
Figura 15. Red de haplotipos para el gen 16S. ....	33
Figura 16. Red de haplotipos para análisis concatenado. ....	34
Figura 17. Árbol de Inferencia Bayesiana para el gen ND4. ....	36
Figura 18. Mejor árbol de Máxima Verosimilitud para el gen. ND4. ....	37
Figura 19. Árbol de consenso para el gen <i>Cyt b</i> . ....	38
Figura 20. Árbol de Inferencia Bayesiana para el gen 16S. ....	39
Figura 21. Mejor árbol de Máxima Verosimilitud para el gen 16S. ....	40
Figura 22. Árbol de consenso para la matriz concatenada. ....	42
Figura 23. Árbol de Inferencia Bayesiana para el gen ND4 con los individuos <i>eximia</i> y <i>arboricola</i> de Bryson <i>et al.</i> (2014b). ....	43
Figura 24. Red de <i>Dryophytes arboricola</i> y <i>D. eximius</i> con secuencias externas de Bryson <i>et al.</i> (2014b). .....	45
Figura 25. Sonogramas de las diferentes poblaciones de <i>Dryophytes arboricola</i> y <i>D. eximius</i> . ....	53
Figura 26. Gráfico del análisis de Componentes Principales de los cantos. ....	54

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Coordenas de colecta de las poblaciones.....	16
Cuadro 2. Primers de los genes mitocondriales usados. ....	19
Cuadro 3. Valores de diversidad genética para el gen ND4.....	26
Cuadro 4. Valores de diversidad genética para el gen <i>Cyt b</i> .....	27
Cuadro 5. Valores de diversidad genética para el gen 16S. ....	27
Cuadro 6. Valores de diversidad genética para la matriz concatenada. ....	28
Cuadro 7. Pruebas de neutralidad para cada gen.....	28
Cuadro 8. Diferenciación poblacional con índices de $F_{ST}$ ( $P \leq 0.05$ ). ....	29
Cuadro 9. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para matriz de genes concatenada con base en valores de $\phi_{iST}$ ( $P \leq 0.05$ ). ....	30
Cuadro 10. Distancias genéticas ( $D_{XY}$ y $D_a$ ) entre clados. ....	44



## RESUMEN

Conocer la variación, estructura y diferenciación genética dentro y entre poblaciones son aspectos fundamentales que pueden ayudar a entender la historia evolutiva de una especie. *Dryophytes arboricola* y *D. eximius* son ranas endémicas de México; la primera se encuentra a grandes elevaciones de la Sierra Madre del Sur en el estado de Guerrero y la segunda se distribuye en bosques de pino y de pino-encino con elevaciones de 900 a 2900 m snm a lo largo del Altiplano Central Mexicano. Estudios respecto a sus cantos han indicado que existe diferenciación con las poblaciones de *D. eximius* donde se encontró variación acústica entre la población de *D. arboricola* en Omiltemi en Guerrero comparada con *Dryophytes eximius* de Tecocomulco en Hidalgo, Pátzcuaro en Michoacán y Álvarez en San Luis Potosí, concluyéndose que se trata de dos especies diferentes. En el presente trabajo se analizó la variación y estructura genética de estas mismas cuatro poblaciones utilizando tres marcadores mitocondriales: ND4, *Cyt b* y 16S para determinar si las diferencias en los cantos están relacionadas con diferencias en la estructura genética y de esa manera corroborar si la población de Omiltemi corresponde también genéticamente a una especie diferente.

Se analizaron 15 muestras de cada una de las cuatro poblaciones. Los marcadores mitocondriales arrojaron niveles altos de diversidad haplotípica ( $h = 0.7 - 0.9$ ) y niveles bajos de diversidad nucleotídica ( $\pi = 0.01 - 0.02$ ). Se identificaron tres grupos que coincidieron entre los análisis de redes de haplotipos, inferencia filogenética (Bayesiana y de Máxima Verosimilitud) y agrupación genética (STRUCTURE). El primer grupo está formado por *D. arboricola* de Omiltemi, el segundo por *Dryophytes eximius* de Tecocomulco y el último por *D. eximius* de Álvarez y Pátzcuaro. La mayor parte de la variación se encontró entre poblaciones (70.73%) y la menor resultó dentro de las poblaciones (25.70%) (AMOVA). Finalmente, las distancias genéticas ( $D_{XY}$ ) para los clados Álvarez-Pátzcuaro con Omiltemi, Álvarez-Pátzcuaro con Tecocomulco y Tecocomulco con Omiltemi fueron del 3%. Esto quiere decir que la población de Omiltemi corresponde a la especie *D. arboricola* de acuerdo al concepto de especie cohesivo de Templeton (1989) donde los factores morfológicos, de comportamiento y genéticos la diferencian de la especie *Dryophytes eximius*.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Cantos en anuros

La comunicación acústica entre los anuros es un aspecto fundamental en su biología reproductiva y su comportamiento social, además de tener un origen temprano en su historia evolutiva (Littlejohn, 1977; Wells, 1988; Allan y Simmons, 1994; Carrillo, 2009). En muchas de las especies de anuros se presenta una gran agregación de individuos que emiten señales sonoras a lo largo de las orillas de cuerpos de agua de hasta más de una docena de especies distintas. En estos coros es en donde existe la competencia por la pareja, donde los machos cantores defienden los recursos requeridos como la comida o los sitios de ovoposición y es donde se da la mayor presión de selección para la elección de las señales; es decir, que en los coros se ve reflejado el éxito reproductivo de los machos (Gerhardt, 1987; Gerhardt y Huber, 2002; Carrillo, 2009).

El repertorio vocal de los anuros es con el que desarrollan la mayoría de sus interacciones sociales. Las señales acústicas que utilizan tienen diferentes finalidades. La principal y más importante es la atracción de hembras por los machos. Existen también señales de advertencia y agresión hacia otros individuos machos, cantos de liberación por parte de las hembras, señales de cortejo de corto rango después del apareamiento, y señales cuando hay depredadores cerca de ellos o cuando son atrapados. Estos tipos de señales juegan un rol importante en su historia natural y evolutiva (Littlejohn, 1977; Schwartz y Wells; Wells, 1988; Gerhardt, 1994; Carrillo, 2009).

## 1.2 El género *Dryophytes*

Dentro de los anfibios se encuentra la familia Hylidae perteneciente al orden Anura. Es el grupo más diverso del orden: 51 géneros con 980 especies. Esta taxón presenta una forma muy conservada y es frecuente que a diferentes especies se les llame con el mismo nombre o se equivoquen al clasificar nuevos organismos (e incluso poblaciones) (Check *et al.*, 2001). Dentro de esta familia se encuentra la subfamilia Hylinae, que se distribuye en Sudamérica, Centroamérica, Norteamérica, Eurasia y el norte de África. Dentro de esta subfamilia se encuentra el género *Dryophytes* (antes referido como *Hyla*), único género de hylinos con distribución en América y fuera de ella (AmphibiaWeb, 2018). Se cree que este grupo ha experimentado una especiación *in situ* en cada región produciendo grupos de especies endémicas en el oeste y este de Norteamérica, Europa y Asia (Hua *et al.*, 2009).

El género *Dryophytes* fue redefinido como un grupo monofilético de especies holárticas y centroamericanas integrado por los siguientes grupos (Figura 1): *D. arborea*, *D. cinerea*, *D. eximius* e *D. versicolor* (Faivovich *et al.*, 2005). Hua *et al.* (2009) agrega el grupo de *D. japonica* y soporta la monofilia del grupo *D. eximius* usando a un individuo de *D. walkeri* que resultó ser taxón hermano del grupo *H. japonica* (Hua *et al.*, 2009).

El último estudio de inferencia filogenética del género *Dryophytes*, por medio 19 genes (incluidos entre ellos 16S, *Cyt b*, 12S, ND1, ND2, COI y RAG1), reorganiza este grupo y soporta la separación de dos clados de los hílidos neárticos. El primero lo conforma el nuevo género *Hyla*, que comprende únicamente a las especies de Europa y Asia; y el segundo reconocido como *Dryophytes* (antes referido como *Hyla*) incluye a todas las especies de América y a tres de Asia. Este último género contiene a 19 especies donde están incluidas las especies de este estudio, bajo el nombre de *Dryophytes arboricola* y *D. eximius* (Duellman *et al.*, 2016). Dentro de las 19 especies en este género, se encuentran incluidas las 11 especies del grupo *D. eximius* descritas por Faivovich *et al.* (2005).

El estudio más reciente de las ranas *Dryophytes* (Duellman *et al.*, 2016) predice el origen de las ranas hílidas hace 61.8 millones de años en el Paleoceno, el clado Hyliinae apareció en el Eoceno o el Oligoceno temprano en Sudamérica hace 32.9 millones de años (30.2- 35.6 m.a.). El género *Hyla* (de especies euroasiáticas) se separó del género *Dryophytes* de especies norteamericanas (antes referido como *Hyla*) en el Mioceno hace 22.6 millones de años. De acuerdo a los autores en el Mioceno medio (15.4 m. a.) el clado que permaneció en América del Norte se diferenció genéticamente y evolucionó en lo que hoy se conoce como *Dryophytes*.

### **1.3 Grupo *Dryophytes eximius***

El grupo *Dryophytes eximius* (antes referido como grupo *Hyla eximia*) incluye siete especies: *D. arenicolor*, *D. bocourti*, *D. euphorbiacea*, *D. eximius*, *D. plicata*, *D. walkeri* y *D. wrightorum* (Duellman, 2001). Eliosa (2001) resucitó a la especie *D. arboricola*, anteriormente descrita por Taylor (1941) y Faivovich *et al.* (2005) incluyeron a *D. andersoni*, *D. japonica* y *D. suweonensis*. Todas estas especies son conocidas como ranas de árbol de montaña y pertenecen al grupo *D. eximius*.

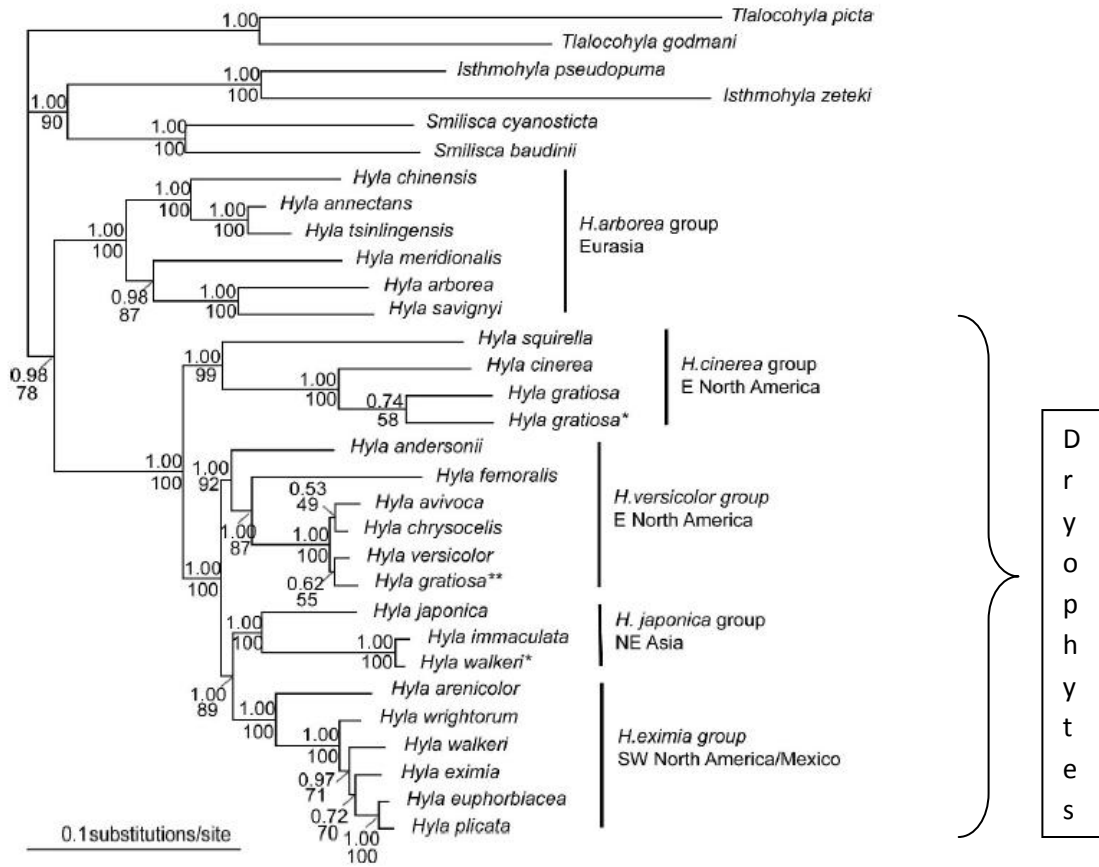


Figura 1. Filogenia de las ranas del género *Hyla* y *Dryophytes* basada en Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud con 10 genes (Hua *et al.*, 2009). Modificado con base en Duellman *et al.* (2016).

#### 1.4 *Dryophytes arboricola* y *D. eximius*

La especie *D. arboricola* es endémica de México y su distribución está restringida a las grandes elevaciones de la Sierra Madre del Sur en el estado de Guerrero (Figura 2). Habita en los bosques de montaña con elevaciones de 2000 m snm. En 1941 Taylor describió a la especie *D. arboricola* en los alrededores de Omiltemi, Guerrero diferenciándola de *D. eximius* por tener una cabeza más ancha, la membrana interdigital más extendida, extremidades sin marcas oscuras, así como por carecer de una marca oscura bien definida a los lados de la cabeza (Figura 3). Esta especie, sin embargo después fue sinonimizada con *D. eximius* por Duellman (1970).



Figura 2. Distribución potencial de *Dryophytes arboricola* y *D. eximius* (modificado de Ochoa-Ochoa et al., 2006).

Estudios recientes en los cantos han sugerido que existe una diferenciación entre las poblaciones de *D. arboricola* con *D. eximius* (Eliosa, 2001; Carrillo, 2009). Eliosa (2001) encontró, además, otras diferencias en la morfología externa de *D. arboricola* como la excrecencia nupcial, la coloración del saco vocal y la extensión de la membrana interdigital de las extremidades posteriores, en comparación con poblaciones de *D. eximius* de Michoacán, Puebla, San Luis Potosí, Jalisco, Durango y Edo. de México. Concluyó que la población de Omiltemi no pertenece a la especie de *D. eximius* y la refiere a *Dryophytes arboricola*.

Carrillo (2009) al comparar detalladamente la variación acústica entre las poblaciones de Álvarez, Tecocomulco, Pátzcuaro y Omiltemi, encontró en la última, una diferenciación en cantos significativa, lo que permitió la separación de la población de Omiltemi.



Figura 3. *Dryophytes arboricola* (1) Omiltemi, Guerrero, México tomada de Naturalista. *D. eximius* (2) Durango, Timothy Burkhardt (2011).

Bryson *et al.* (2014a) demostraron que los fenómenos de introgresión mitocondrial y captura de genes están presentes entre todas las especies del grupo de *D. eximius* por medio de genes mitocondriales (ND4, ATP6 y ATP8) y nucleares (POMC, cryB y Tyr1). Encontraron que *D. eximius* es parafilético. Para los análisis filogeográficos solo se utilizaron los genes mitocondriales y se identificaron dos clados dentro del grupo *D. eximius*: el primero constituido por la mayoría de los individuos de *D. arenicolor* y el segundo que contiene a las especies de Balsas, algunas de *D. arenicolor* y a las especies morfológica y ecológicamente similares *D. eximius*, *D. wrightorum*, *D. plicata*, *D. ephorbiacea*, *D. arboricola* y *D. walkeri*. La especie *D. eximius* a su vez, se agrupó en cuatro linajes diferentes: OrS (sudeste de la Sierra Madre Oriental), OcS (sudeste de la Sierra Madre Occidental), CMP (Altiplanicie Mexicana) y DGO (Durango) (Figura 4). De acuerdo a los autores, la discordancia entre los genes mitocondriales y nucleares indica introgresión dentro del grupo *Dryophytes eximius* por lo que sugieren que el árbol nuclear (Figura 5) es el que debe tomarse como el árbol de especies, ya que en este árbol todos los linajes de *D. eximius* forman un grupo monofilético consistente con la información morfológica y de cantos. Aún así, el ADN mitocondrial resultó un marcador imprescindible para delimitar linajes geográficos dentro del grupo *D. eximius*. Los resultados mitocondriales indican que *Dryophytes arboricola* (antes referida como *H. arboricola*) se incluye en *Dryophytes eximius*, pero los datos nucleares indicaron que son dos especies diferentes y distantes en el árbol. El análisis concatenado señala que *Dryophytes arboricola* se agrupa con el linaje OrS (Sierra

Madre Oriental) de *Dryophytes eximius*, pero sumando los tres linajes OrS, OcS (Sierra Madre Occidental) y CMP (Altiplano Mexicano), debe ser incluida en esta especie (Figura 4 y 5).

Debido a la ausencia de estudios de la especie, se encuentra catalogada como Deficiente de Información por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN).

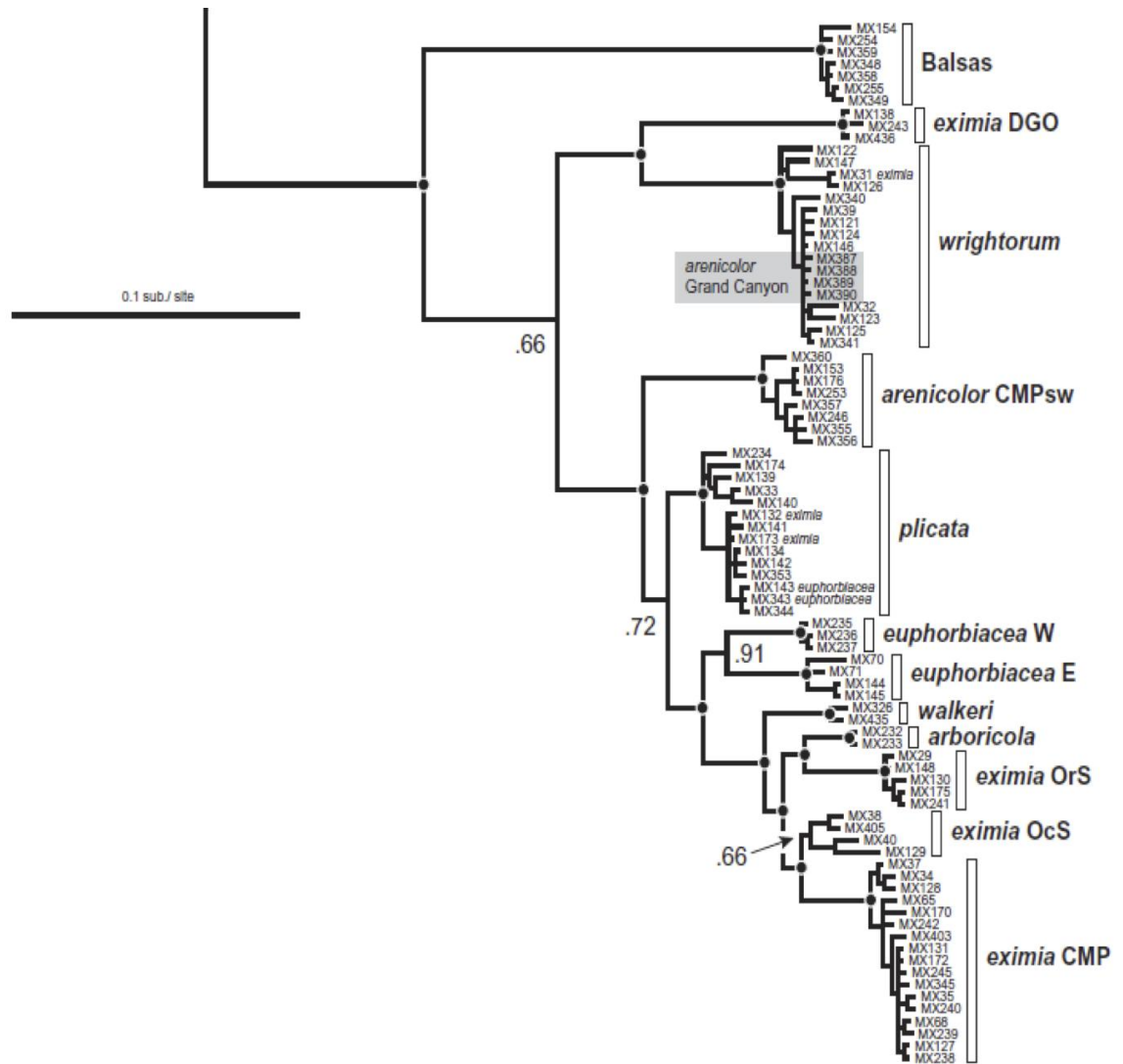


Figura 4. Estructura filogeográfica con genes mitocondriales dentro de uno de los clados del grupo *D. eximius* (antes referido como *H. eximia*). En la parte inferior se observan los linajes de *D. eximius* donde *eximia* CMP y *eximia* OcS pertenecen a un clado; y *eximia* OrS y *arboricola* pertenecen a otro clado diferente (Bryson *et al.*, 2014a).

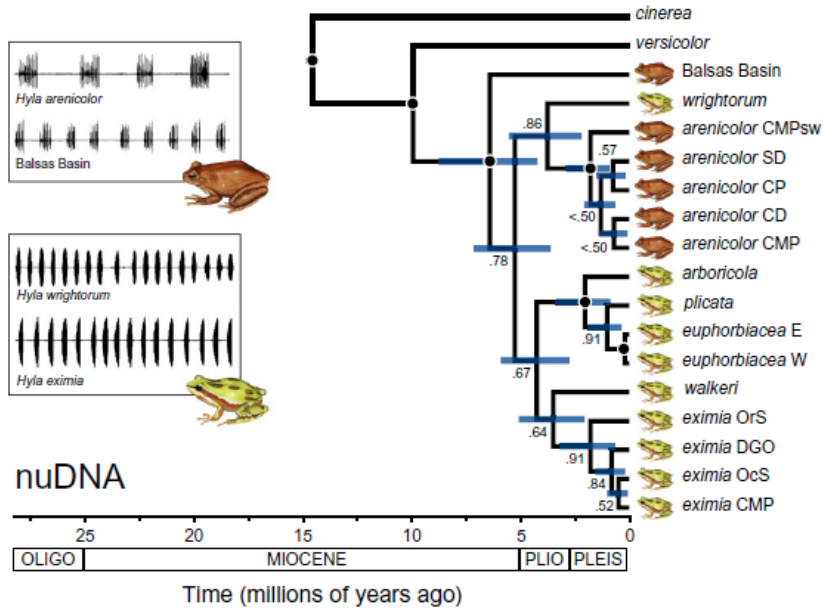


Figura 5. Reconstrucción de árbol de especies del grupo *D. eximius* (antes referido como *H. eximia*) con genes nucleares (Bryson *et al.*, 2014a). Se observa *arboricola* como especie diferente de *eximia* OrS, *eximia* DGO, *eximia* OcS y *eximia* CMP.

Por su parte, la especie *D. eximius* es endémica de México y de amplia distribución desde las Sierras y Llanuras del Norte hasta el Eje Neovolcánico (Figura 2). Su hábitat principal son los bosques de pino y de pino-encino con elevaciones de 900 a 2900 m snm. *Dryophytes eximius* se encuentra catalogada por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) como especie bajo preocupación menor, donde se incluyen las especies que son abundantes y presentan amplia distribución. La especie se caracteriza por su piel lisa y talla pequeña, la cabeza más estrecha que el cuerpo y la parte dorsal poco convexa, el hocico largo con lengua cordiforme y libre posteriormente en un cuarto de su longitud, los brazos cortos y delgados con manos sin membrana interdigital ni axilar. Las extremidades posteriores cortas y robustas con membranas interdigitales que se extienden hasta dos tercios de la longitud de los dedos que terminan en discos bien desarrollados y los talones apenas se superponen cuando se ponen las patas en ángulo recto respecto del cuerpo. Los adultos tienen un tamaño de 1.9 a 5.6 cm de largo y presentan un patrón de coloración que va del verde al pardo con líneas negras que atraviesan la longitud del cuerpo. Los machos tienen la garganta verde mientras que en las hembras es blanca. La cabeza tiene una línea lateral que inicia en el hocico y se extiende por la parte de atrás del nostrilo, el ojo y el tímpano y continúa por los costados hasta la ingle (Stebbins, 2003) (Figura 3).



Desde la descripción de *Dryophytes eximius* (Baird, 1854) han habido varios problemas para la identificación de muchas de sus poblaciones y se han hecho varias sinonimias con otras especies. El principal problema es que *D. eximius* presenta gran variabilidad en tamaño y proporciones del cuerpo y extremidades, variación en el patrón de coloración, así como en los parámetros de los cantos nupciales (Eliosa, 2001; Carrillo, 2009; Rodríguez-Tejeda *et al.*, 2014).

Sin embargo, hasta el momento no se han realizado estudios de genética a nivel poblacional de *D. arboricola* en Omiltemi comparando con otras poblaciones para verificar si en realidad se trata de una especie diferente. Omiltemi, Guerrero goza de una gran riqueza biológica y endemismo ya que forma parte del sistema orográfico meridional constituido por la Sierra Madre del Sur, la cual es una unidad morfotectónica compleja, bastante antigua y extensa favoreciendo así el aislamiento y diferenciación de especies (Luna y Llorente, 1993). En el estudio de Bryson *et al.* (2014a) el linaje de Omiltemi es mantenida como una especie distinta a pesar de que se agrupa dentro de su clado *eximia* CMP+OcS+ *arboricola*+ OrS; y Duellman *et al.* (2016) no incluyen esta especie en su análisis, asumiendo que es una especie válida referida a *Dryophytes*.

Este estudio pretende poner a prueba la inclusión de *D. arboricola* dentro de la especie *D. eximius* y dentro del clado *eximia* OrS, según lo propuso Bryson *et al.* (2014a) incrementando el tamaño de muestra de poblaciones separadas, incluyendo 15 muestras de cada una de tres poblaciones de *Dryophytes eximius* de Álvarez, San Luis Potosí y Pázcuaru, Michoacán representando el linaje Altiplano Mexicano (*eximia* CMP) y *eximia* OcS; y Tecocomulco, Hidalgo, el linaje *eximia* OrS (Bryson *et al.*, 2014a) y 15 muestras de *D. arboricola* de Omiltemi, Guerrero, la localidad tipo de la especie, con la idea de incrementar la variación genética de cada población.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Concepto de especie y límite de especies

Elegir el concepto de especie que mejor se adapte a nuestro tema de investigación determina que información será relevante para tener una visión de como funciona la especiación (Wiens, 2004). Uno de los conceptos de especie más empleados en el área de genética poblacional y evolutiva, así como en biología de la conservación (Frankham, 2004) es el concepto de especie biológica de Mayr (1942), que lo definió como grupos de poblaciones naturales cuyos individuos se entrecruzan actual o potencialmente dando origen a descendencia fértil y que están reproductivamente aislados de otros grupos similares. También es importante el concepto cohesivo de especie de Templeton (1989) que dice que las especies corresponden a grupos de individuos que conservan su similitud morfológica, ecológica, genética, del comportamiento y las historias de vida a través del flujo genético que ocurre entre ellos, donde los factores genéticos y ecológicos funcionan como fuerzas cohesivas. Este último concepto es el más integrador y completo realizado no sólo en el nivel teórico, sino también en el nivel operacional en el reconocimiento y delimitación de unidades evolutivas (Cerritos, 2007).

La especiación forma el puente entre la evolución de las poblaciones y la evolución de la diversidad taxonómica (Futyma, 2005). Bush (1994) definió a la especiación como un proceso de divergencia de linajes, los cuáles son suficientemente distintos uno de otro para tener su propia independencia evolutiva. El evento crucial para el origen de una nueva especie es, en la mayoría de los casos, el aislamiento reproductivo, e indiscutiblemente es la llave para la búsqueda de la especiación. Existen dos maneras de que surjan las especies. La primera es la diversificación, cuando una especie principal da surgimiento a dos o más especies descendientes. Ocurre cuando las poblaciones se diferencian genéticamente llegando a tener aislamiento reproductivo y frecuentemente involucra por lo menos aislamiento físico parcial. La segunda manera es el cambio gradual dentro de una especie lo largo del tiempo para que se considere una especie diferente en otro momento (Frankham, 2004).

Los factores para el aislamiento físico regularmente corresponden a los cambios geográficos (como montañas, desertificación, ríos, cambios en el nivel del mar y deriva continental) o del movimiento de organismos a nuevos territorios. Cuando las poblaciones aisladas llegan a ser tan diferentes que no se cruzan en un segundo contacto, la especiación se conoce como alopátrica. Esta es la forma más común de la especiación en animales. Por otro

lado, cuando la divergencia se produce sin separación geográfica entre las poblaciones; es decir, dentro del rango ancestral de la especie, se conoce como especiación simpátrica (Frankham, 2004).

Cuando un agrupamiento se hace bajo criterios que reconozcan y delimiten el resultado del proceso de especiación estamos ante un grupo natural. En caso contrario, un grupo artificial es aquel en el que hay una inclusión parcial o una inclusión de organismos que pertenecen a más de una entidad evolutiva (Ward, 1998). A diferencia de las clasificaciones antiguas, donde únicamente se usaban comparaciones morfológicas o de similitud, hoy en día se buscan las relaciones verdaderas; es decir, una clasificación natural. Es por eso que los análisis genéticos moleculares de los organismos se han convertido en los más usados para estudios de sistématica. Una de las grandes ventajas de realizar estudios con datos moleculares es que se trabaja directamente con la base genética de la variación, mientras que en la mayoría de los trabajos morfológicos la base genética se asume; además, los caracteres pueden ser seleccionados y definidos de una manera más objetiva (Hillis y Wiens, 2000).

## **2.2 Genética y estructura poblacional**

Las variaciones moleculares genéticas (alélicas o nucleotídicas) dentro de las secuencias, proporcionan la descripción de la variación genética de los organismos (Hedrick, 2000). Por medio de los estudios de genética poblacional, se pueden obtener datos medibles de la manera en que se distribuye la variación genética dentro y entre las poblaciones.

Las fuentes que generan variación genética en las poblaciones son mutación, flujo génico, recombinación y selección balanceadora. La deriva génica y la selección direccional son dos fuerzas evolutivas que reducen y modifican esta variación (Griffiths *et al.*, 2004).

De acuerdo a Hedrick (2011), una población es un grupo de individuos con entrecruzamiento que existen juntos en tiempo y espacio. Una población puede presentar diferencias en la variación genética entre sus subpoblaciones observada como una estructura genética. La estructura genética se define como la cantidad y distribución de variación genética dentro y entre poblaciones de una especie (Gillespie, 2004). La estructura genética poblacional es producto de los patrones de flujo génico, la migración, la deriva génica y la dinámica demográfica de las poblaciones (Schaal *et al.*, 1998). En muchos casos existe diferenciación

genética, por lo que se generan subgrupos o subpoblaciones al interior de una o varias poblaciones (Gillespie, 2004).

Los anfibios son pequeños en su tamaño corporal y presentan baja movilidad por lo que sus poblaciones tienden a ser genéticamente estructuradas respecto a una distribución geográfica pequeña, además de retener señales de alta resolución de eventos históricos que generaron la distribución de las especies actuales (Palo *et al.*, 2004; Zeisset y Beebee, 2008). Se ha encontrado en muchas especies una relación entre la filogenia basada en ADN mitocondrial y la distribución geográfica de sus linajes (estructura filogeográfica). El estudio de esta relación entre genealogía y geografía de una especie constituye la filogeografía intraespecífica (Avise *et al.*, 1987). La unidad de estudio de la filogeografía es el individuo, y más estrictamente, el haplotipo. Un haplotipo representa los alelos en genes ligados en una copia de un cromosoma (Hedrick, 2011). Los haplotipos registran la historia de eventos mutacionales y pueden conectarse mediante una red de haplotipos (Posada y Crandall, 2001). El patrón filogeográfico más conspicuo es aquel donde se encuentra una subdivisión genealógica marcada entre poblaciones o grupos de poblaciones (haplogrupos) y una marcada estructuración espacial (alopátrica) (Vázquez-Domínguez, 2007). Una de las aplicaciones más amplias de los estudios filogeográficos ha sido el poder determinar la estructura poblacional de la especie (o las especies, en caso de ser filogeografía comparada) a lo largo de su distribución, así como descifrar los procesos que han determinado dicha distribución (Avise *et al.*, 1987; Avise, 1998).

Para realizar un análisis filogeográfico, es necesario inferir el árbol de genes y de poblaciones de la especie o especies a tratar. El árbol de genes es la filogenia de un fragmento de ADN en particular que puede ser estimado por medio de la secuencia de nucleótidos o aminoácidos, mapas de sitio de restricción, entre otros; y el árbol de poblaciones es el camino evolutivo de un grupo de poblaciones (Avise, 1989). Existen muchos árboles de genes dentro de un árbol de poblaciones o un árbol de especies y de hecho un árbol de poblaciones debe representar una compilación de genealogías de varios genes (Avise, 1989). Generalmente las inferencias filogenéticas se realizan a partir de secuencias de ADN mitocondrial y son una forma de dilucidar las relaciones evolutivas entre organismos. Las filogenias inferidas a partir de secuencias de ADN mitocondrial representan la historia de las secuencias, obtenida por medio de sus eventos mutacionales y de la diferenciación de las líneas maternas (Avise *et al.*, 1987). La filogenia de genes y la demografía de poblaciones están íntimamente relacionadas, por lo que las

variables demográficas son factores decisivos que definen la profundidad, la forma y los patrones demográficos de los árboles de genes (Vázquez-Domínguez, 2007).

### **2.3 ADN mitocondrial**

Los marcadores moleculares permiten detectar diferencias y similitudes (conocidas como polimorfismos) presentes en el ADN de los organismos de origen. Son biomoléculas de ADN o proteínas que permiten evaluar la variación presente entre organismos de poblaciones de una especie (Avise, 1994; Li, 2000). El ADN mitocondrial es el marcador molecular más utilizado para estudios de filogeografía y estructura poblacional en animales (Avise *et al.*, 1987; Avise *et al.*, 1998).

El genoma mitocondrial en vertebrados contiene la información que codifica para 37 genes que incluyen 13 proteínas implicadas en el transporte de electrones como Citocromo b, 22 genes que codifican para ARNs de transferencia (ARNt) y genes que codifican para las dos sub unidades de ARN ribosomal (12S ARNr y 16S ARNr) (Wilson *et al.*, 1985). A diferencia del genoma nuclear, la mayor parte del genoma mitocondrial tiene una función, por lo que no presenta intrones y es poco frecuente la presencia de espaciadores, secuencias repetitivas y pseudogenes mitocondriales (Carranza, 2002). Una de las principales características del ADN mitocondrial como marcador molecular, es que es heredado únicamente por vía materna y es haploide por lo que las diferencias encontradas entre individuos se deben exclusivamente a eventos de mutación y no son el resultado de recombinación. Así como que su tamaño efectivo es la mitad del nuclear por lo que cambia más lento que el núcleo permitiendo detectar eventos relativamente antiguos (Avise *et al.*, 1987; Avise, 1998). En animales, el contenido de los genes mitocondriales está altamente conservado con muy pocas duplicaciones y con cortas regiones intergénicas (Gissi *et al.*, 2008).

Experimentalmente el ADN mitocondrial es muy fácil de amplificar debido a que existen varias copias en la célula (Wilson *et al.*, 1985); además, es altamente variable en poblaciones naturales animales por su alta tasa de mutación, lo cual puede revelar señales acerca de la historia de vida de las poblaciones en periodos de tiempo cortos (Avise, 1994). Al presentar variación considerable entre individuos dentro y entre poblaciones, el ADN mitocondrial ha demostrado ser un excelente marcador de estructura de poblaciones, revelando patrones de variación geográfica intraespecífica (Harrison, 1989) (Anexo I).

### III. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Establecer las bases genéticas de la diferenciación entre las poblaciones de *Dryophytes arboricola* de Omiltemi, Guerrero y *D. eximius* en Álvarez, San Luis Potosí, Pátzcuaro, Michoacán y Tecocomulco, Hidalgo por medio de los marcadores mitocondriales ND4, Cyt b y 16S.

#### 3.2 Objetivos particulares

Analizar la variación genética de las poblaciones de Omiltemi, Álvarez, Pátzcuaro y Tecocomulco a partir de marcadores mitocondriales.

Analizar los patrones de estructura genética inter e intra poblacional de las poblaciones incluidas en el estudio.

Definir la estructura genética de las poblaciones en relación con los patrones de canto entre *D. arboricola* y las poblaciones de *Dryophytes eximius*.

Establecer las relaciones entre linajes diferenciados de *D. arboricola* para con *Dryophytes eximius*.

Corroborar la identidad de *D. arboricola* de Omiltemi como una especie diferente a *D. eximius*.

#### **IV. JUSTIFICACIÓN**

En la actualidad no existe ningún estudio poblacional basado en genética que nos permita dilucidar si la especie *Dryphytes arboricola* es una especie diferente a *D. eximius*, y si esta diferencia es concordante con los patrones de canto encontrados anteriormente (Eliosa, 2001; Carrillo, 2009).

#### **V. HIPÓTESIS**

Considerando que la población de *D. arboricola* se encuentra distribuida disyuntamente a la población de *D. eximius*, y en una zona de alta endemidad en Omiltemi, se espera encontrar una estructura poblacional que diferencie a la primera especie plenamente de la segunda conforme a la diferenciación encontrada en los estudios de cantos.

#### **VI. PREDICCIONES**

La variación mitocondrial de la población de *D. arboricola* de Omiltemi presentará una menor variabilidad genética con respecto a las demás poblaciones debido a que es una especie restringida geográficamente y de población pequeña.

Existirá una gran diferenciación genética entre las poblaciones de *D. arboricola* de Omiltemi con respecto a las poblaciones de *D. eximius*, debido a que *D. arboricola* se encuentra aislada geográficamente de *D. eximius*.

Se espera que las poblaciones de *D. eximius* en Álvarez, Pázcuaru y Tecocomulco estén más relacionadas entre ellas, teniendo a *D. arboricola* como especie hermana.

Habrará una correspondencia entre la divergencia acústica y la divergencia genética entre las poblaciones estudiadas.

## VII. MATERIALES Y MÉTODO

### 7.1 Área de estudio

Se trabajó con las cuatro poblaciones de *Dryophytes eximius* de Carrillo (2009): Álvarez, Pátzcuaro, Tecocomulco y Omiltemi (Figura 6) con las cuales se demostraron diferencias en el canto entre ellas. La localidad de Álvarez en San Luis Potosí corresponde a la región de La Sierra de Álvarez y presenta una vegetación de zonas templadas principalmente bosques de pino-encino, con áreas de pastoreo, cultivo y vegetación xerófila en la parte baja.

El Lago de Pátzcuaro en Michoacán es un cuerpo de agua del Sistema Volcánico Transversal con vegetación acuática y bosque de pino-encino, bosque de oyamel y matorral subtropical en los alrededores.

La Laguna de Tecocomulco está dentro de los territorios de los estados de Hidalgo, Puebla y Tlaxcala. Hay vegetación acuática y está rodeado por bosques de pino y pino-encino.

La localidad de Omiltemi en Guerrero se ubica en la parte central del estado dentro de la Sierra Madre del Sur a 15 km al oeste de la ciudad de Chilpancingo. Presenta una vegetación de bosque de pino, bosque de pino-encino y bosque mesófilo (Carrillo, 2009) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Coordenadas de colecta de las poblaciones.

	<b>Estado</b>	<b>Nº de muestras analizadas</b>	<b>Coordenadas de colecta</b>
<b>Álvarez</b>	San Luis Potosí	15	22° 01' N 100° 35' O
<b>Omiltemi</b>	Guerrero	15	17° 35' N 99° 38' O
<b>Pátzcuaro</b>	Michoacán	15	19° 31' N 101° 32' O
<b>Tecocomulco</b>	Hidalgo	15	19° 42' N 98° 11' O



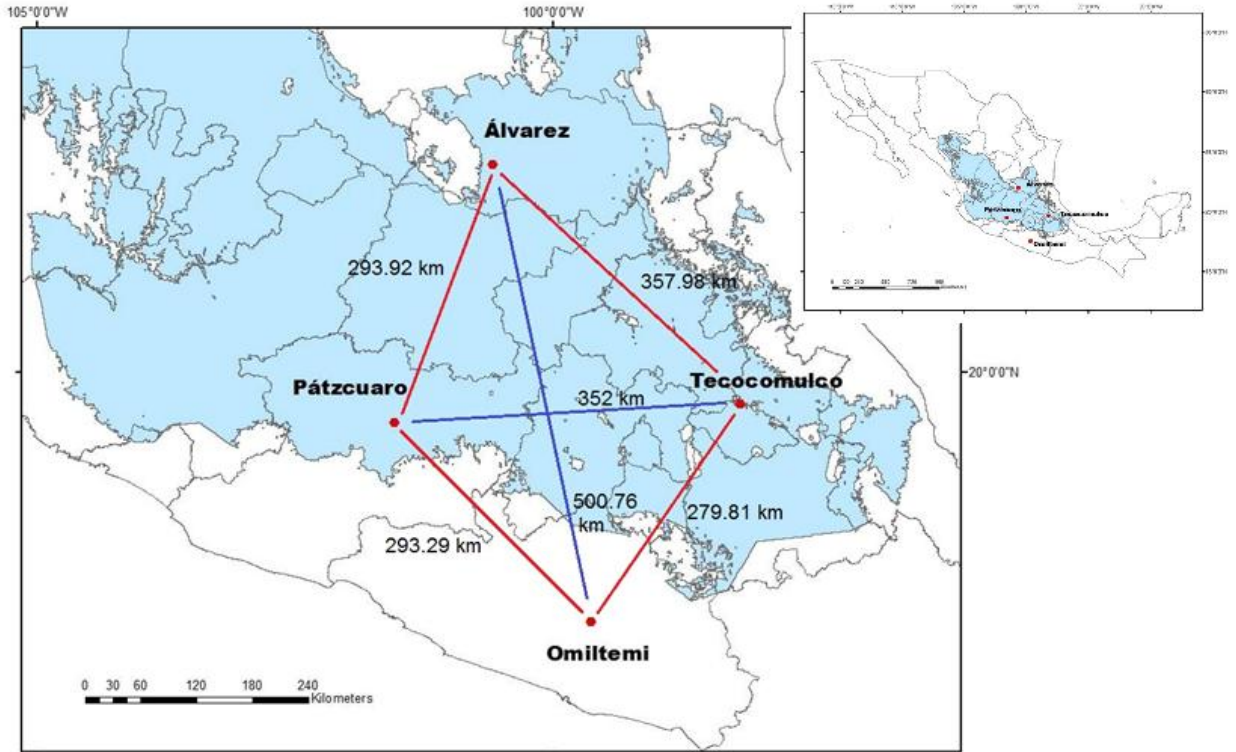


Figura 6. Distancias geográficas entre las localidades de colecta de las poblaciones de *Dryophytes arboricola* y *D. eximius*. Los puntos de color rojo son las poblaciones. El área de color azul es la distribución potencial de la especie *D. eximius* (Ochoa-Ochoa *et al.*, 2006).

## 7.2 Trabajo de campo

### 7.2.1 Obtención de ejemplares

Se utilizaron 66 individuos provenientes del muestreo de Carrillo (2009) depositados en la Colección Nacional de Anfibios y Reptiles del Instituto de Biología de la UNAM (CNAR, IBH 29576 al 29643): 20 individuos de Tecocomulco, 8 de Álvarez, 15 de Pátzcuaro y 23 de Omiltemi.

Para aumentar el tamaño de muestra de la población de Álvarez, se realizaron dos salidas de campo con muestreos intensivos nocturnos a dicha localidad entre los días 10 al 12 de julio y 31 de julio al 2 de agosto del 2015. Se recolectaron 14 individuos los cuales fueron fijados en etanol al 96% e ingresados a la CNAR con los números de colección IBH del 31003 al 31016 (Figura 7).



Figura 7. Ejemplares de *D. eximius* de la población de Álvarez etiquetados con su IBH.

### 7.3 Trabajo de laboratorio

#### 7.3.1 Extracción de ADN

Se escogieron 15 muestras de cada población considerando a los individuos mejor conservados y con mayor masa muscular en las extremidades posteriores. Se realizó la extracción de ADN con el kit comercial ADN Blood & Tissue (QIAGEN) con algunas modificaciones a partir de una porción del músculo vasto externo del muslo (Anexo II).

#### 7.3.2 Visualización de ADN

Para verificar la integridad, cantidad relativa y calidad del ADN extraído, se realizaron visualizaciones de la extracción de cada uno de los individuos, en geles de agarosa al 1% + TAE 1X con 2.5  $\mu$ l de ADN teñidos con 0.7  $\mu$ l de Redgel (1X) y examinados bajo luz ultra violeta (Figura 8).

Se cuantificó el ADN para conocer la concentración y el grado de pureza de cada muestra en un espectrofotómetro Nano Drop 2000.

#### 7.3.3 Diseño y elección de primers

Se diseñaron primers específicos para la amplificación de los genes mitocondriales *Cyt b* y ND4 con los programas MEGA 6.1 (Tamura *et al.*, 2013) y BLAST Primers de la base de datos de GenBank, a partir de 24 secuencias de *Dryophytes eximius* (GenBank Accession Numbers: KJ719624.1 - KJ719651.1) para *Cyt b* y con cinco secuencias de *Dryophytes eximius* (GenBank Accession Numbers: HM152337.1- HM152341.1) para ND4. Para la amplificación del gen 16S se utilizaron los primers 16SL1 y 16SH1 de Gvozdík *et al.* (2010). Todos los primers fueron sintetizados en el Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM (Cuadro 2).

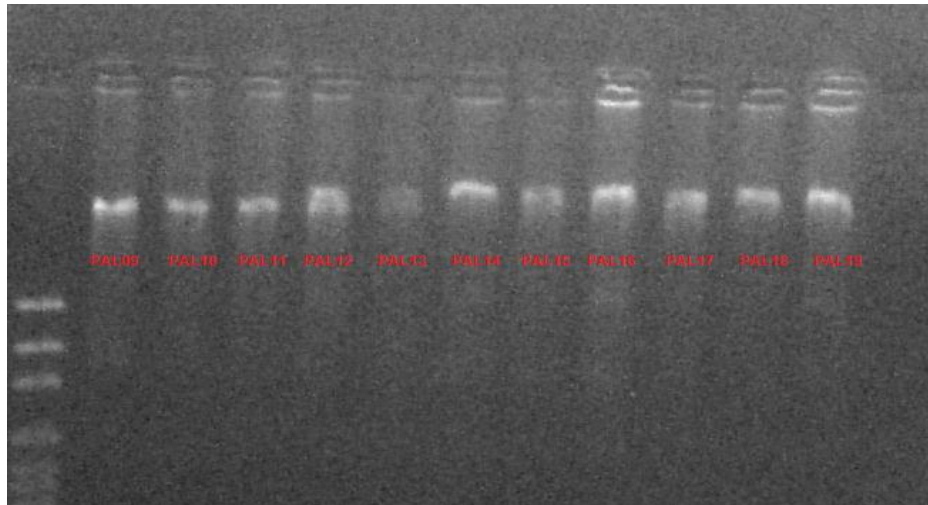


Figura 8. Foto de las extracciones de ADN de la población de Álvarez.

Cuadro 2. Primers de los genes mitocondriales usados.

Gen	Primers
<b>Cyt b</b> (diseño propio)	F 5' C TTCACATTGGGCGAGGTCT 3' R 5' GCGTGGAACGGGATTTTGTC 3'
<b>ND4</b> (diseño propio)	F 5' GGCAGCCCCCTTAATTGTCT 3' R 5' TAGTGCGGCTATGAGCCATC 3'
<b>16S</b> (Gvozđík <i>et al.</i> , 2010)	F 16SL1 5' CGCCTGTTTAACAAAAACAT 3' R 16SH1 5' CCGGTCTGAACTCAGATCACGT 3'

#### 7.3.4 Gradientes de temperatura

Se realizaron gradientes de temperatura en cada gen para determinar la temperatura de alineamiento. Para el gen *Cyt b* el gradiente se realizó de los 57 °C a los 68 °C (Figura 9), para 16S de 54 °C a 64 °C y para ND4 de 60 °C a 70 °C. Las temperaturas elegidas fueron 63 °C, 55 °C y 61 °C respectivamente.

Las temperaturas fueron seleccionadas por dos criterios: 1) cuando la amplificación se veía mejor tanto en calidad como cantidad; y, 2) cuando mayor fuera su temperatura (a mayor temperatura mayor especificidad).

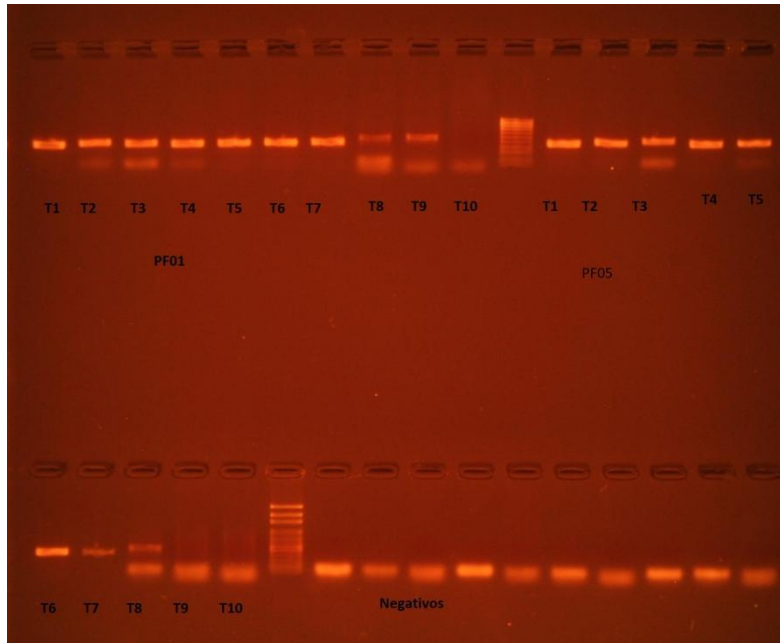


Figura 9. Gradiente de temperatura para *Cyt b*. Se definieron 10 temperaturas diferentes (T1 = 57 °C, T2 = 57.8 °C, T3 = 58.7 °C, T4 = 59.9 °C, T5 = 61.4 °C, T6 = 63.3 °C, T7 = 64.9 °C, T8 = 66.1 °C, T9 = 67.2 °C, T10 = 68 °C). En este caso se escogió la temperatura T6.

### 7.3.5 Amplificación de genes

Se siguió el procedimiento de Mullis *et al.* (1986) para la amplificación de ADN por medio de PCR. Para los tres genes se usaron las mismas cantidades de reactivos: 1 µl para cada uno de los primers F y R (a concentración 10 µM), 0.38 µl de MgCl (a concentración 1.5 µM), 1 µl de dNTP's (a concentración 0.2 µM), 0.25 de Taq polimerasa (1.25 U), 1.3 µl de buffer de amortiguamiento, 5.57 µl de H<sub>2</sub>O y 2 µl de ADN de templado con un volumen final de 12.5 µl. El ciclo de amplificación así como las temperaturas de alineamiento variaron para cada gen (Figura 10).

La amplificación de los PCR se validó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1.5%+ TAE 1X teñidos con 0.7 µl de Redgel (1X).

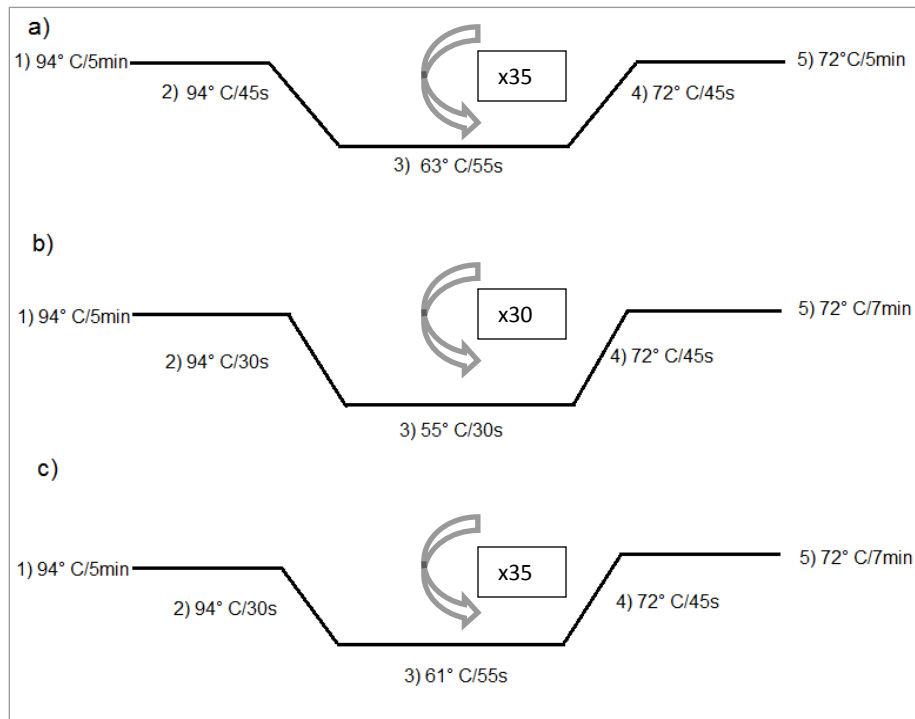


Figura 10. Protocolo de las ampliaciones por medio de PCR para cada gen: a) *Cyt b*, b) 16S y c) ND4. Los números son los pasos de la amplificación: 1) desnaturalización inicial, 2) desnaturalización, 3) alineamiento, 4) extensión y 5) extensión final.

### 7.3.6 Purificación de las muestras

Las muestras fueron purificadas de dNTP's y otros elementos no incorporados durante el PCR con el método de precipitación Etanol-Acetato de sodio (NaAc 3M, pH= 5.2) en el caso del gen *Cyt b* (Anexo III). Para el gen 16S las purificaciones de ADN se llevaron a cabo con el kit de purificación de PCR de InVitrogen. (Anexo IV). Para el gen ND4 no fue necesario llevar a cabo purificación.

### 7.3.7 Secuenciación

Los productos purificados se secuenciaron en el Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud en el Instituto de Biología, UNAM por medio de secuenciación Sanger con el secuenciador Applied Biosystems 3730xL. Tanto la secuencia F (forward) como la R (reverse) de cada individuo.

## 7.4 Análisis de datos

Se corroboró que cada secuencia correspondiera a la especie de interés, realizando un BLAST en GenBank.

### 7.4.1 Edición de secuencias

Los cromatogramas (Figura 11) se visualizaron en el programa Finch TV 1.4.0 (Patterson, 2004). Para la edición de las secuencias y creación de las secuencias consenso se utilizó el programa SeqTrace 0.9.0 (Stucky, 2012). Se corroboraron las secuencias consenso con BLAST teniendo como soporte una identidad y cobertura mayor del 90% a la especie *Dryophytes eximius*.

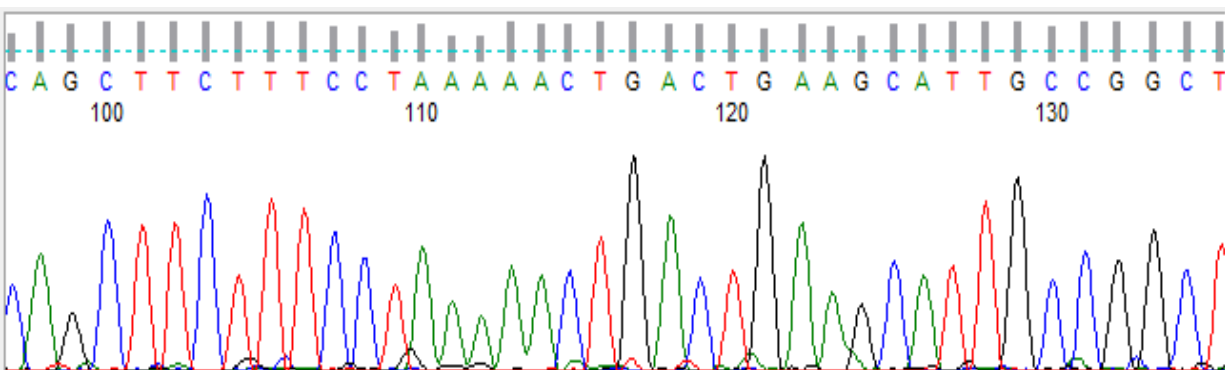


Figura 11. Sección de un cromatograma de la secuencia F de AL04 (población de Álvarez) para ND4.

### 7.4.2 Alineamiento de secuencias

La alineación de secuencias se llevó a cabo en el programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013) con el algoritmo de Muscle (Edgar, 2004). El alineamiento se hizo por población y luego con toda la muestra en total. Se realizó una verificación y edición para cada gen “a ojo”, así como la eliminación de los extremos de las secuencias.

Los análisis de diversidad genética, redes de haplotipos y árboles de genes se hicieron por gen y de forma concatenada. Para concatenar las tres matrices de los genes se utilizó el programa Sequence Matrix 1.8 (Vaidya *et al.*, 2011).

## 7.5 Análisis para la diferenciación entre poblaciones

### 7.5.1 Diversidad genética

Los análisis para calcular medidas de diversidad genética: número de sitios variables e informativos, número de haplotipos, diversidad nucleotídica (Nei, 1987), diversidad haplotípica

(Nei, 1987) y número promedio de diferencias entre nucleótidos  $K$  (Tajima, 1983) se realizaron con el programa DNAsp 5.1 (Librado y Rozas, 2009). Estos datos se obtuvieron por población y por gen.

Se realizaron diferentes pruebas estadísticas para determinar si los marcadores utilizados en este estudio asumen un modelo de evolución neutral. Las pruebas fueron:  $D$  de Tajima (Tajima, 1989),  $F$  y  $D$  (Fu y Li, 1993) y  $F_u$  (Fu, 1997). Estos datos se realizaron con el número total de mutaciones en el programa DNAsp 5.1 (Librado y Rozas, 2009).

### 7.5.2 Estructura genética

Se calcularon en Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005) los índices de diferenciación poblacional por medio de  $F_{ST}$  y sus valores de significancia entre las poblaciones usando 1000 permutaciones. Las  $F_{ST}$  pareadas pueden ser usadas como distancias genéticas a corto plazo entre poblaciones. Cuando el valor del índice de fijación resulta 0, indica que las poblaciones son genéticamente idénticas (ausencia o mínima diversidad genética entre las poblaciones); si el valor indica 1, las poblaciones son genéticamente diferentes (grado máximo de diversidad genética entre las poblaciones).

Se llevó a cabo un análisis Bayesiano de agrupación genética sin considerar *a priori* las localidades de colecta con el programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000). Este programa estima el número más probable de grupos genéticos ( $K$ ), así como la asignación de cada individuo a determinado grupo genético a partir de su genotipo. Utiliza las cadenas de Markov con el método de Monte Carlo y estima la verosimilitud de que los datos concuerden con la hipótesis de  $K$  agrupamientos. El análisis se realizó con la matriz concatenada usando únicamente los sitios polimórficos. Este formato de números se obtuvo con el programa GenAlEx 6.5 (Peakall y Smouse, 2012). Para este análisis se excluyeron dos individuos: uno de la población de Pátzcuaro (PA02) y otro de la población de Omiltemi (OM11) al no tener la amplificación completa. Los parámetros que se usaron para las corridas fueron el modelo de mezcla (donde se estiman proporciones de mezcla para cada individuo) y frecuencias relacionadas con 50,000 pasos iniciales de calentamiento seguidos de 100,000 simulaciones. Se realizaron 10 corridas para cada una de las  $K$  supuestas (se usó K1- K5) para determinar el valor más adecuado de  $K$  por medio del programa STRUCTURE HARVESTER (Earl y VonHoldt, 2012).

### 7.5.3 Variación intra e inter poblacional

Se llevó a cabo un análisis de varianza molecular (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992), el cual utiliza las frecuencias haplotípicas y el número de mutaciones entre haplotipos para calcular los estadísticos llamados *Phi* ( $\Phi$ , análogos a los estadísticos F para marcadores haploides), que resumen el grado de diferenciación entre las divisiones de las poblaciones asociados con diferentes niveles jerárquicos definidos *a priori*: dentro de las poblaciones ( $Phi_{ST}$ ), entre poblaciones dentro de los grupos ( $Phi_{SC}$ ) y entre regiones, a través de un procedimiento de permutaciones no paramétricas. Se realizó con la matriz de genes concatenada utilizando todos los sitios (variables e invariables) en el programa Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005) con 50 000 permutaciones y con el método de distancia de diferencias pareadas. Se calcularon los índices  $Phi_{ST}$  como estimadores de las diferencias entre poblaciones. Las regiones utilizadas fueron tres (de acuerdo a los resultados de las redes de haplotipos, inferencia filogenética y estructura genética), donde Álvarez y Pátzcuaro se contaron como una sola región, Omiltemi y Tecocomulco como regiones independientes.

## 7.6 Analisis para establecer las relaciones entre poblaciones

### 7.6.1 Redes de haplotipos

Una forma de representar las relaciones entre los haplotipos es por medio de redes de haplotipos. Se calculó la red en el programa de Network 5.0 (Bandelt *et al.*, 1999) con el estimado de Median Joining con los valores predeterminados. Este método permite la introducción de vectores medios que representan haplotipos intermedios ausentes a partir del número de sustituciones pareadas. El número de pasos en las ramas indica la cantidad de mutaciones entre los haplotipos; mientras más larga sea, mayor número de mutaciones habrá. Las redes se realizaron sin enraizar.

### 7.6.2 Inferencia filogenética

Las filogenias inferidas a partir de secuencias de ADN mitocondrial representan la historia hipotética de las secuencias, obtenida por medio de sus eventos mutacionales y de la diferenciación de las líneas maternas (Avise *et al.*, 1987). Se realizaron dos tipos de análisis: Inferencia Bayesiana con el programa de Mr. Bayes 3. 2. 5 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001) y Máxima Verosimilitud utilizando RAxML GUI (Silvestro y Michalak, 2012) obteniendo un árbol por gen y por matriz concatenada para cada tipo de método. Los modelos de sustitución



nucleotídica se escogieron por medio de jModel-test 2.1.7 con el Criterio de Información Akaike (AIC) (Posada y Crandall, 1998). Para el análisis Bayesiano se implementaron dos corridas independientes de 10 millones de generaciones con 4 cadenas de MCMC muestreando cada 10 000 generaciones con una temperatura de 0.1. Se eliminó el 25% del *burn-in* (*relburnin*). El árbol usado en este análisis fue el consenso. En el caso de RaxML el modelo de sustitución que se usó fue GTR+G para todos los marcadores mitocondriales y se realizó la búsqueda de ML+ *through bootstrap* con 10 búsquedas y 10 000 réplicas de *bootstrap*.

También se realizó un análisis de Inferencia Bayesiana con el programa de Mr. Bayes 3.2.5 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001) con la incorporación de las dos secuencias de *D. arboricola* y 14 secuencias de *D. eximius* (Bryson *et al.*, 2014a) tomadas de DRYAD (Bryson *et al.*, 2014b) con el único gen disponible ND4. Los parámetros del análisis fueron los mismos que los demás árboles.

Como grupo externo se utilizó a un individuo de la especie *Dryophytes versicolor* para cada gen (H-ver) obtenido de la base de datos GenBank, NCBI (GenBank Accession Numbers: HM152329.1, AY831021.1 y AY843682.1).

### 7.6.3 Distancias genéticas entre clados

El cálculo de las distancias genéticas permite estudiar la diferenciación entre las poblaciones. De acuerdo a los resultados de las redes de haplotipos, inferencia filogenética y estructura genética se calculó la divergencia entre los clados resultantes con el programa DNAsp 5.1 (Librado y Rozas, 2009) con los valores de  $D_{XY}$  y  $D_a$  (Nei, 1987). El índice  $D_{XY}$  indica el número promedio de sustituciones nucleotídicas por sitio entre poblaciones y el índice  $D_a$  el número de sustituciones nucleotídicas netas por sitio entre poblaciones. Ambos asumen que las diferencias son causadas por mutación y deriva genética.

### 7.6.4 Red con *Dryophytes arboricola*

Por último se realizó una red sin enraizar con el programa Splits Tree 4 (Huson y Bryant, 2006), donde se incorporaron dos secuencias de *D. arboricola* y 14 secuencias de *D. eximius* (Bryson *et al.*, 2014a) tomadas de DRYAD (Bryson *et al.*, 2014b) con el único gen disponible ND4. La red se realizó como Neighbor Net, con el modelo de sustitución GTR y con 100 réplicas de *bootstrap*.

## VIII. RESULTADOS

### 8.1 Diversidad genética

Se obtuvieron 60 secuencias (15 por población) de 261 pb para el gen ND4 que resultaron en 17 haplotipos. La diversidad haplotípica global ( $h$ ) es de 0.862 y una diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) de 0.0224. La población de Álvarez presentó la mayor diversidad haplotípica ( $h=0.723$ ) y la menor diversidad se encontró en la población de Omiltemi con un  $h = 0.361$  (Cuadro 3). Se encontraron 27 sitios variables (Sn) de los cuales 17 resultaron informativos.

Cuadro 3. Valores de diversidad genética para el gen ND4. Donde  $h$  es la diversidad haplotípica global,  $\pi$  representa la diversidad nucleotídica y  $k$  el número promedio de diferencias entre nucleótidos.

Población	Sitios Variables	No. De Haplotipos	$\pi$	$h$	$k$
Álvarez	8	7	0.0058	0.723	1.504
Omiltemi	2	3	0.0014	0.361	0.380
Pátzcuaro	4	4	0.0036	0.638	0.933
Tecocomulco	8	5	0.0045	0.476	1.180
<b>Total</b>	27	17	0.0224	0.862	5.818

Para el gen *Cyt b* se amplificaron 60 secuencias (15 por población) con un tamaño de 317 pb, con 24 sitios variables, 17 sitios informativos y 16 haplotipos. La diversidad haplotípica ( $h$ ) es de 0.787 y la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) es de 0.0211. La mayor diversidad haplotípica se presentó en la población de Tecocomulco con un  $h = 0.828$  y la menor diversidad en la población de Omiltemi con un  $h = 0$  (Cuadro 4).

En caso del gen 16S se obtuvieron 59 secuencias con 509 pb, teniendo 37 sitios variables de los cuáles 16 sitios fueron informativos. El número total de mutaciones fue 38 y resultaron 21 haplotipos. La diversidad haplotípica ( $h$ ) es de 0.875 y la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) es de 0.0112. La población con mayor diversidad haplotípica es Tecocomulco con un  $h = 0.780$  y la población con menor diversidad es Álvarez con un  $h = 0.542$  (Cuadro 5).

Cuadro 4. Valores de diversidad genética para el gen *Cyt b*. Donde  $h$  es la diversidad haplotípica global,  $\pi$  representa la diversidad nucleotídica y  $k$  el número promedio de diferencias entre nucleótidos.

Población	Sitios variables	No. de haplotipos	$\pi$	$h$	$k$
Álvarez	5	5	0.0028	0.476	0.780
Omiltemi	0	1	0	0	0
Pátzcuaro	4	4	0.0023	0.466	0.647
Tecocomulco	15	8	0.0090	0.828	0.251
<b>Total</b>	24	16	0.0211	0.787	5.875

Cuadro 5. Valores de diversidad genética para el gen 16S. Donde  $h$  es la diversidad haplotípica global,  $\pi$  representa la diversidad nucleotídica y  $k$  el número promedio de diferencias entre nucleótidos.

Población	Sitios variables	No. de haplotipos	$\pi$	$h$	$k$
Álvarez	5	4	0.0021	0.542	0.990
Omiltemi	5	4	0.0025	0.666	1.180
Pátzcuaro	17	7	0.0055	0.692	2.549
Tecocomulco	15	7	0.0054	0.780	2.514
<b>Total</b>	37	21	0.0112	0.875	5.215

En el análisis concatenado se utilizaron las 60 secuencias (15 por población) con un total de 1087 pares de bases. Se observaron 51 sitios polimórficos de los cuáles 34 fueron informativos. Se obtuvieron 27 haplotipos con una diversidad haplotípica ( $h$ ) de 0.915 y una diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) de 0.0217. La población con mayor diversidad es Tecocomulco teniendo un  $h = 0.942$  y la población menos diversa con un  $h = 0.361$  es Omiltemi (Cuadro 6).

En las pruebas de neutralidad, para el caso del gen ND4, *Cyt b* y la matriz concatenada la D de Tajima, D de Fu y Li, F de Fu y Li, y Fs de Fu resultaron no significativas, pero en el gen 16S la D y F de Fu y Li resultaron estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) (Cuadro 7).

Cuadro 6. Valores de diversidad genética para la matriz concatenada. Donde  $h$  es la diversidad haplotípica global,  $\pi$  representa la diversidad nucleotídica y  $k$  el número promedio de diferencias entre nucleótidos.

Población	Sitios Variables	No. de haplotipos	$\pi$	$h$	$k$
Álvarez	13	10	0.0042	0.85710	2.285
Omiltemi	2	3	0.0007	0.3619	0.380
Pátzcuaro	8	5	0.0029	0.7523	1.580
Tecocomulco	23	11	0.0068	0.9428	3.695
<b>Total</b>	51	27	0.0217	0.915	11.693

Cuadro 7. Pruebas de neutralidad para cada gen. \* con diferencias significativas.

Gen	D de Tajima	D de Fu y Li	F de Fu y Li	Fs de Fu
ND4	0.015 P>0.10	-1.274 P>0.10	-0.961 P>0.10	-1.080
Cyt b	0.448 P>0.10	-0.600 P>0.10	-0.265 P>0.10	-0.487
16S	-1.201 P>0.10	-3.195* P<0.05	-2.934* P<0.05	-4.561
Concatenado	0.233 P>0.10	-1.076 P>0.10	-0.697 P>0.10	-2.504

## 8.2 Estructura genética

Los índices  $F_{ST}$  pareados indican que las poblaciones más diferenciadas son Omiltemi y Tecocomulco con respecto a las otras dos localidades. Las poblaciones que comparten más similitud son Álvarez-Pátzcuaro ( $F_{ST} = 0.117$ ), las que presentan mayor diferenciación son Omiltemi-Álvarez ( $F_{ST} = 0.834$ ) y Omiltemi-Pátzcuaro ( $F_{ST} = 0.838$ ). Entre Omiltemi y Tecocomulco existe suficiente diferenciación ( $F_{ST} = 0.709$ ) para ser unidades poblacionales independientes (Cuadro 8).

En la prueba con los genes concatenados se identificó el valor de grupos genéticos con una  $K = 3$  ( $-\ln = -493.85$ ). En el grupo de color morado se tienen a las poblaciones de Álvarez y Pátzcuaro (29 individuos), en el grupo verde se tiene a la población de Omiltemi (14 individuos) y el grupo rojo representa a la población Tecocomulco con 15 individuos (Figura 12). En la población de Tecocomulco se encuentra un individuo (TE03) que presenta en mayor proporción

información genética del grupo Álvarez-Pátzcuaro. También la población de Omiltemi presenta un individuo (OM09) con información genética del mismo grupo de color morado.

Cuadro 8. Diferenciación poblacional con índices de  $F_{ST}$  ( $P \leq 0.05$ ).

	Álvarez	Pátzcuaro	Omiltemi	Tecocomulco
Álvarez	-			
Pátzcuaro	0.117 (P = 0.030)	-		
Omiltemi	0.834 (P = 0.0)	0.838 (P = 0.0)	-	
Tecocomulco	0.685 (P = 0.0)	0.685 (P = 0.0)	0.709 (P = 0.0)	-

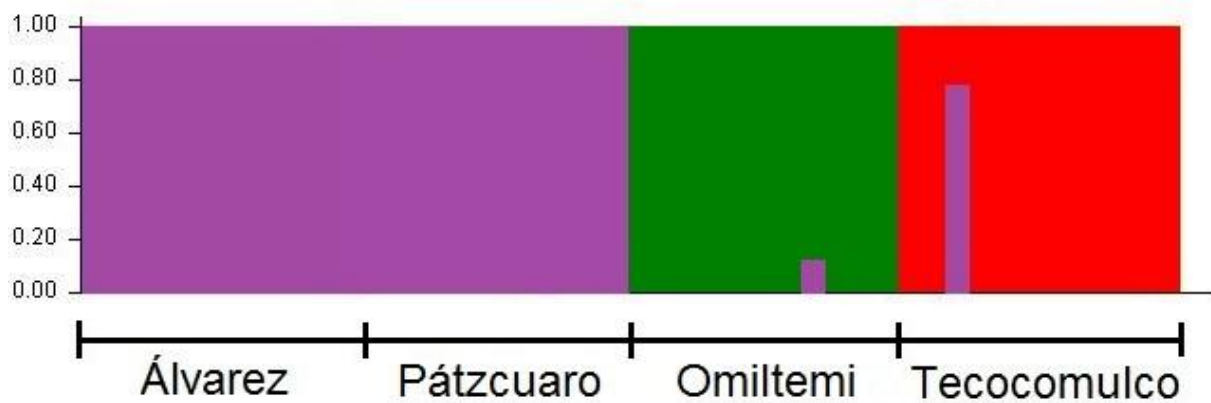


Figura 12. Estructura genética de cuatro poblaciones de *Dryophytes arboricola* y *D. eximius* estimada por medio del programa STRUCTURE mostrando tres agrupamientos.

### 8.3 Variación intra e interpoblacional

El análisis de variación molecular arrojó, con base en los valores de  $Phi_{ST}$ , que el mayor porcentaje de variación se encuentra entre las tres regiones (70.73%), posteriormente en la variación dentro de las poblaciones (25.70%) y la menor variación se encuentra entre poblaciones dentro de las regiones (3.57%) (Cuadro 9).

Cuadro 9. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para matriz de genes concatenada con base en valores de  $\Phi_{ST}$ : ( $P \leq 0.05$ ).

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	% de variación	P
Entre regiones	2	449.183	11.3026	70.73	0.16401
Entre poblaciones dentro de las regiones	1	12.667	0.5706	3.57	0.02256
Dentro de poblaciones	56	230	4.1071	25.70	0
<b>Total</b>	<b>59</b>	<b>691.85</b>	<b>15.9804</b>	<b>100</b>	

**Índice de fijación  $\Phi_{ST}$ : 0.7429**

#### 8.4 Redes de haplotipos

La red de haplotipos construida con el gen ND4 muestra tres grupos de haplotipos (haplogrupos). El primero está conformado por las poblaciones de Álvarez y Pátzcuaro, el segundo por la población de Omiltemi y el tercer haplogrupo por la población de Tecocomulco (Figura 13). El grupo conformado por la población de Álvarez y Pátzcuaro tiene nueve haplotipos donde siete son exclusivos para Álvarez y los dos restantes son compartidos para ambas poblaciones (H1 y H4). El grupo conformado por Omiltemi consta de tres haplotipos, el haplotipo ocho está presente en 12 individuos, mientras que el haplotipo nueve está integrado por dos individuos y el haplotipo 10 sólo con uno. El último haplogrupo está constituido por cinco haplotipos de la población de Tecocomulco donde el haplotipo 13 tiene 11 individuos (Anexo V).

El haplotipo 14 (TE03) que corresponde a un individuo de la población de Tecocomulco se encuentra separado del resto de su población debido a la ocurrencia de nueve pasos mutacionales. De forma similar, el haplotipo 11 (PA02) de Pátzcuaro presenta más mutaciones que lo alejan del grupo formado por Álvarez- Pátzcuaro.

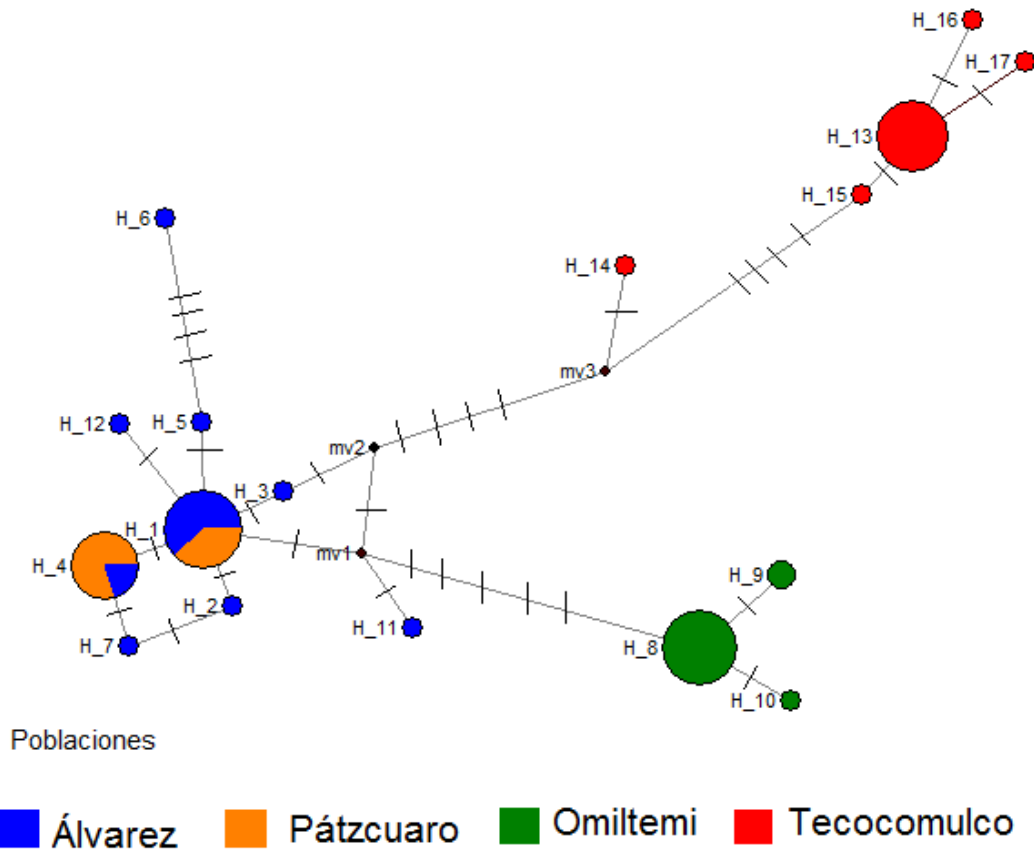


Figura 13. Rede de haplotipos para el gen ND4 en *Dryophytes arboricola* y *D. eximius*. Las bandas diagonales entre cada haplotipo representan las mutaciones entre ellos. Los puntos negros mv (1-3) representan los haplotipos faltantes.

En el gen *Cyt b* se observó una estructura de red de haplotipos muy similar a la de ND4: 16 haplotipos en tres haplogrupos principales (Figura 14). El grupo conformado principalmente por las poblaciones de Álvarez y Pátzcuaro tiene ocho haplotipos donde cuatro son exclusivos para Álvarez, tres para Pátzcuaro y un haplotipo central donde convergen las poblaciones de Álvarez, Pátzcuaro y un individuo de Tecocomulco (TE03). El segundo grupo está conformado por la población de Omiltemi con un único haplotipo para todos los individuos. El tercer grupo está conformado por la población de Tecocomulco con 14 individuos distribuidos en siete haplotipos siendo el haplotipo 12 el más grande del haplogrupo con seis organismos (Anexo V).

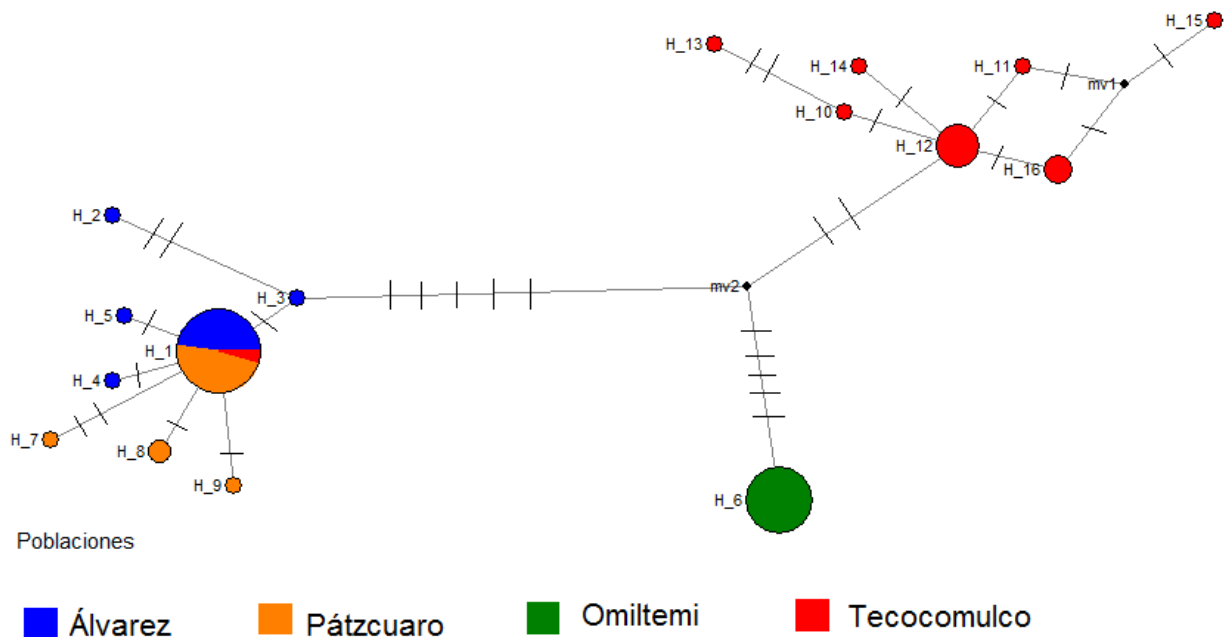


Figura 14. Red de haplotipos para el gen *Cyt b* en *Dryophytes arboricola* y *D. eximius*. Las bandas diagonales entre cada haplotipo representan las mutaciones entre ellos. Los puntos negros mv (1, 2) representan los haplotipos faltantes.

En el caso del marcador mitocondrial 16S se observó una estructura diferente a la de los genes anteriores. El primer haplogrupo está conformado por las poblaciones de Álvarez y Pátzcuaro y el segundo por la población de Omiltemi y Tecocomulco (Figura 15). En el primer haplogrupo se encuentran 11 haplotipos donde un haplotipo es central y convergen las poblaciones de Álvarez y Pátzcuaro, seis corresponden a la población de Pátzcuaro, tres haplotipos a la población de Álvarez y un haplotipo a un individuo de Tecocomulco (TE03). El segundo grupo está conformado por la población de Omiltemi y Tecocomulco donde se encuentran cuatro haplotipos para Omiltemi y seis para Tecocomulco. A pesar de que se encuentran en el mismo grupo, estas poblaciones mantienen su distancia una de otra y no comparten ningún haplotipo (Anexo V). En esta red, así como en la de *Cyt b*, también se observa al individuo TE03 (H\_6) en el haplogrupo que corresponde a las poblaciones de Álvarez y Pátzcuaro.



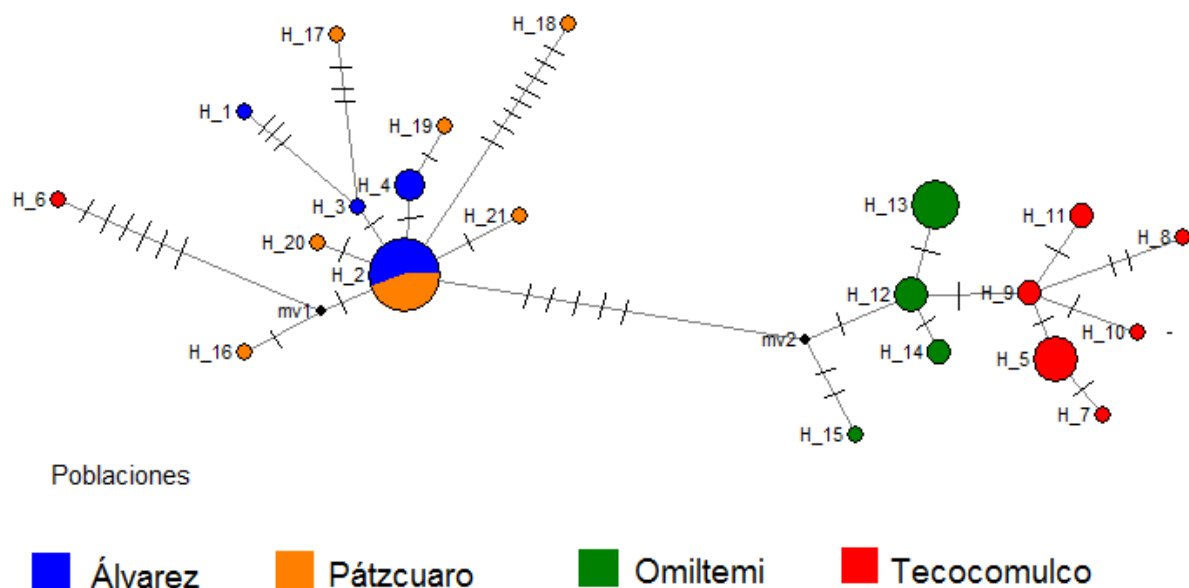


Figura 15. Red de haplotipos para el gen 16S en *Dryophytes arboricola* y *D. eximius*. Las bandas diagonales entre cada haplotipo representan las mutaciones entre ellos. Los puntos negros mv (1, 2) representan los haplotipos faltantes.

Con el análisis concatenado se rescataron los tres haplogrupos formados en los genes de ND4 y *Cyt b* (Figura 16). El primer haplogrupo se encontró constituido por tres haplotipos (H\_6, H\_8 y H\_9), todos individuos de la población de Omiltemi. El segundo haplogrupo está constituido por la población de Tecocomulco con 10 haplotipos formando una estructura de estrella. El tercer haplogrupo está conformado por las poblaciones de Álvarez y Pátzcuaro con un total de 13 haplotipos donde ocho son exclusivos para Álvarez, tres para Pátzcuaro y dos haplotipos compartidos (Anexo V).

Así como en la red del gen ND4, el haplotipo 19 (TE03) que corresponde a un individuo de la población de Tecocomulco se encuentra separado del resto del haplogrupo por 12 pasos mutacionales. Lo mismo ocurre con el haplotipo 14 (PA02) de la población de Pátzcuaro, que presenta menos cambios mutacionales y se separa de los individuos de su población.

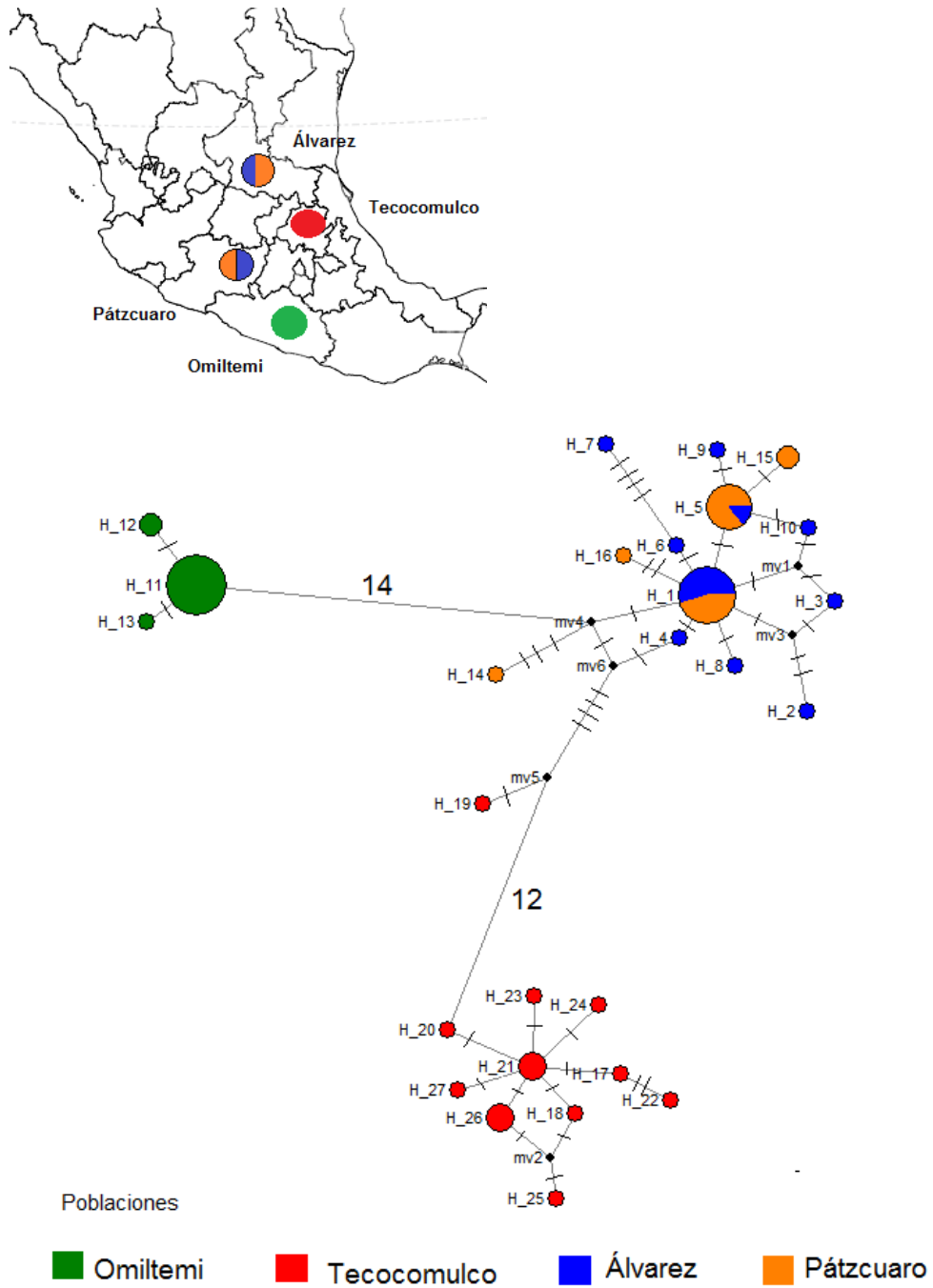


Figura 16. Red de haplotipos para análisis concatenado en *Dryophytes arboricola* y *D. eximius*. Las bandas diagonales entre cada haplotipo representan las mutaciones entre ellos. Los puntos negros mv (1-6) representan los haplotipos faltantes. Arriba de la red se representan las poblaciones en un mapa.

## 8.5 Inferencia filogenética

Los modelos de sustitución nucleotídica para cada loci fueron los siguientes: para ND4 fue GTR+G, para *Cyt b* fue HKY+G y para 16S se eligió TPM2uf+G. Los tres modelos se escogieron por medio del Criterio de Información Akaike (AIC) por sus valores de verosimilitud y con un intervalo de confianza del 95%.

El análisis de Inferencia Bayesiana obtenido, basado en el gen ND4 (Figura 17), indica la presencia de dos clados principales. El primero es monofilético con una probabilidad posterior de 1 y lo constituye la población de Tecocomulco exceptuando al individuo TE03. El segundo clado con una probabilidad posterior de 0.984 también es monofilético e incluye dos subclados. Uno de los subclados incluye a todos los individuos de la población de Omiltemi con una probabilidad posterior de 1 y a su vez el individuo OM08 y OM12 forman otro pequeño grupo con 0.964 de probabilidad posterior. El otro subclado es el más grande ya que incluye a la población de Álvarez y Pátzcuaro con una probabilidad posterior de 0.996. Dentro de este subclado se encuentra un grupo monofilético con una probabilidad posterior de 0.781 donde se encuentran todos los individuos excepto PA02. El individuo TE03 no se encuentra dentro de ningún grupo, está sin resolverse.

Con el análisis de Máxima Verosimilitud se rescata la misma topología que con el análisis Bayesiano (Figura 18). Sin embargo, en el subclado Álvarez-Pátzcuaro se encuentra un pequeño grupo de dos individuos (AL04 con AL19) que no está presente en el otro análisis. En este caso el individuo TE03 también se encuentra sin resolverse ya que no pertenece a ninguno de los subclados.

Con el gen *Cyt b* las topologías resultantes de ambos análisis fueron iguales por lo que sólo se presenta un árbol con los valores de verosimilitud y de probabilidad posterior (Figura 19). Así como en el gen ND4, también se observan dos clados. La población completa de Omiltemi se encuentra en uno de los clados con una probabilidad posterior de 0.84 y 95 de bootstrap. En el segundo clado se encuentran dos subclados con una probabilidad posterior de 0.57 y 56 de bootstrap. Uno de los subclados lo compone la población de Tecocomulco, excepto el individuo TE03 con una probabilidad posterior de 0.87 y 80 de bootstrap. El otro subclado incluye a la población de Álvarez, Pátzcuaro y el individuo TE03 con una probabilidad posterior de 0.99 y 95 de bootstrap. En este gen, el individuo TE03 se encuentra resuelto dentro del clado de Álvarez-Pátzcuaro.

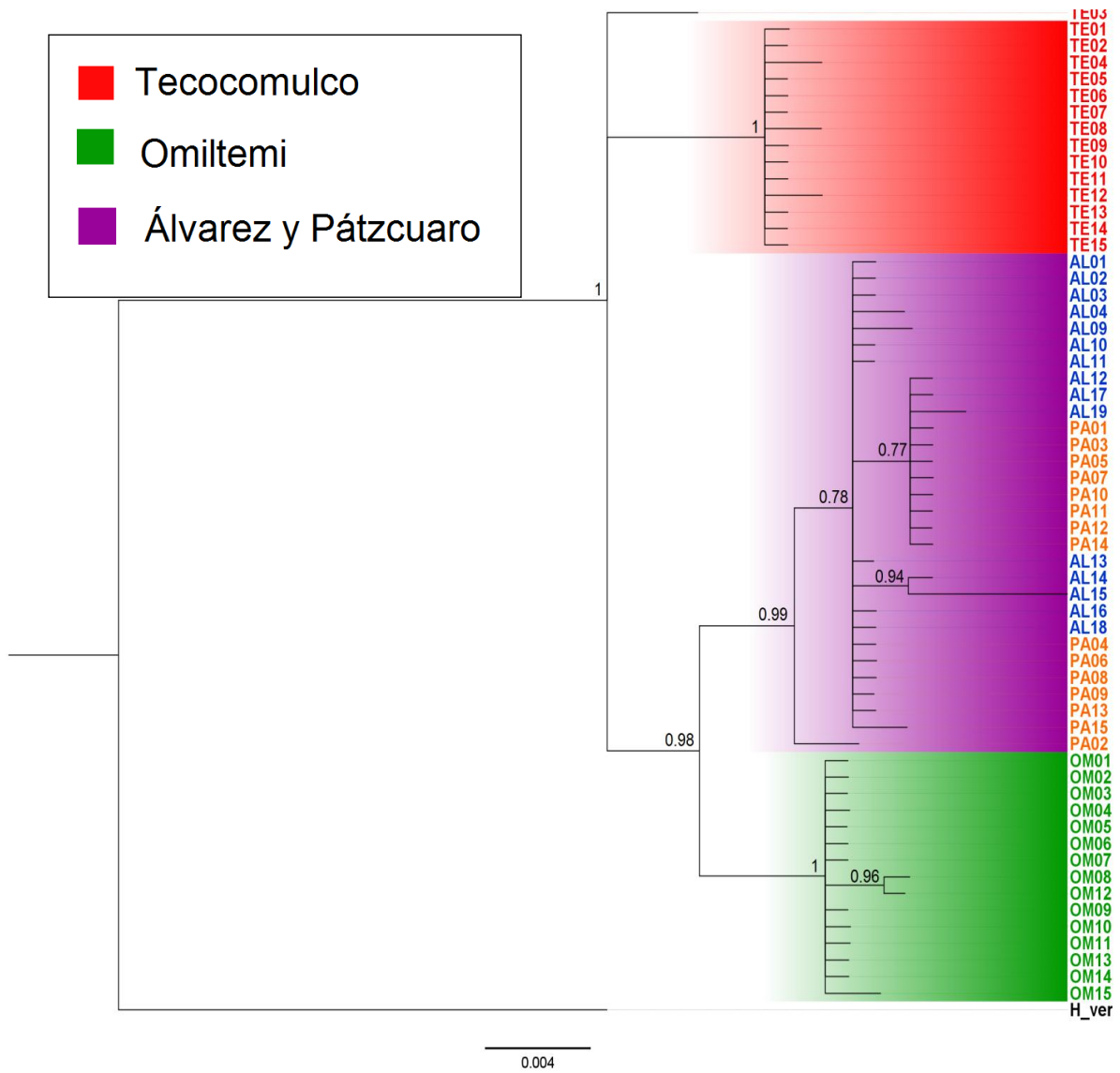


Figura 17. Árbol de Inferencia Bayesiana para el gen ND4. Los números indican el valor de la probabilidad posterior.

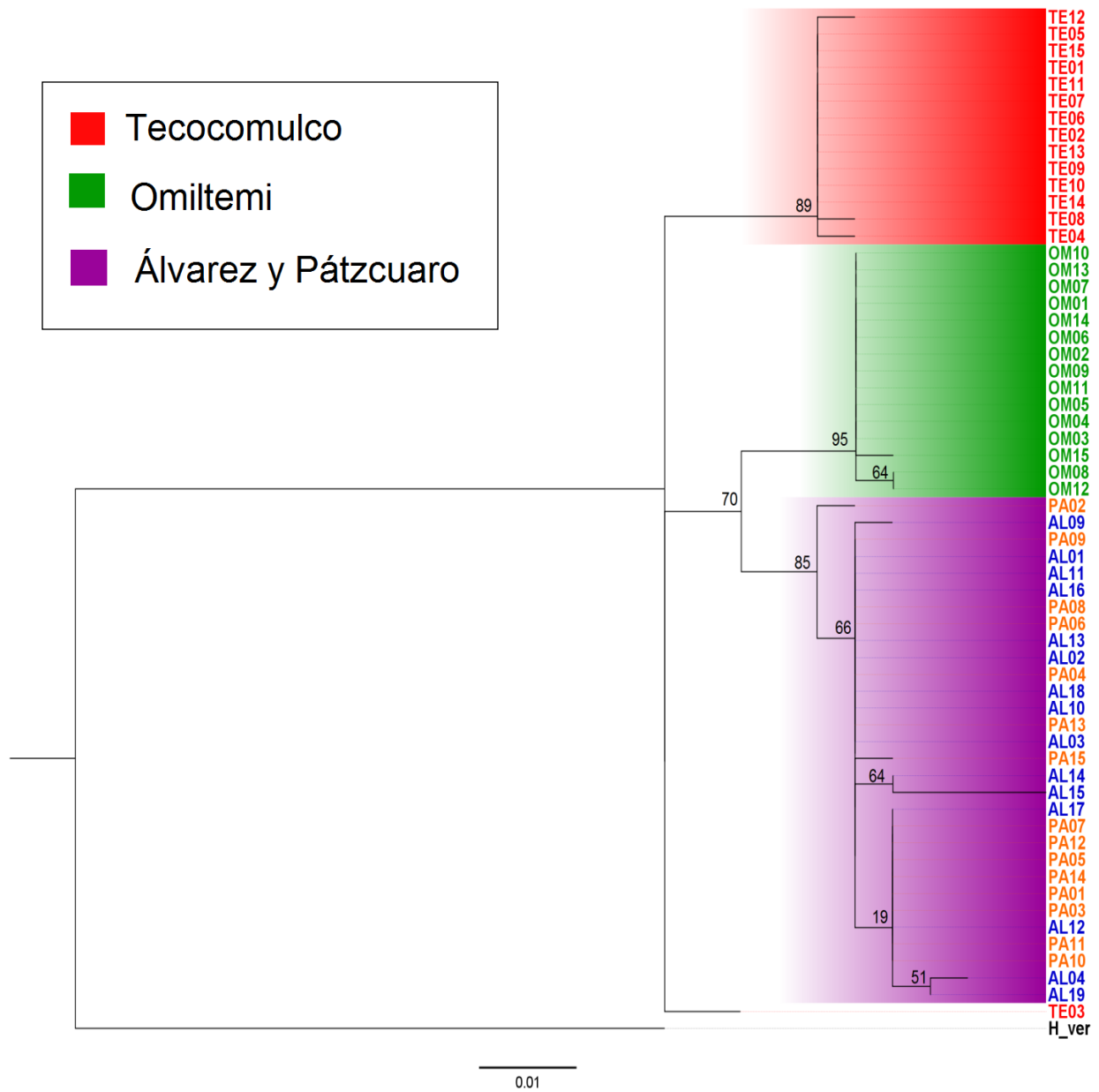


Figura 18. Árbol de Máxima Verosimilitud para el gen ND4. Los valores en los nodos indican el soporte de bootstrap, basado en 10 000 réplicas.

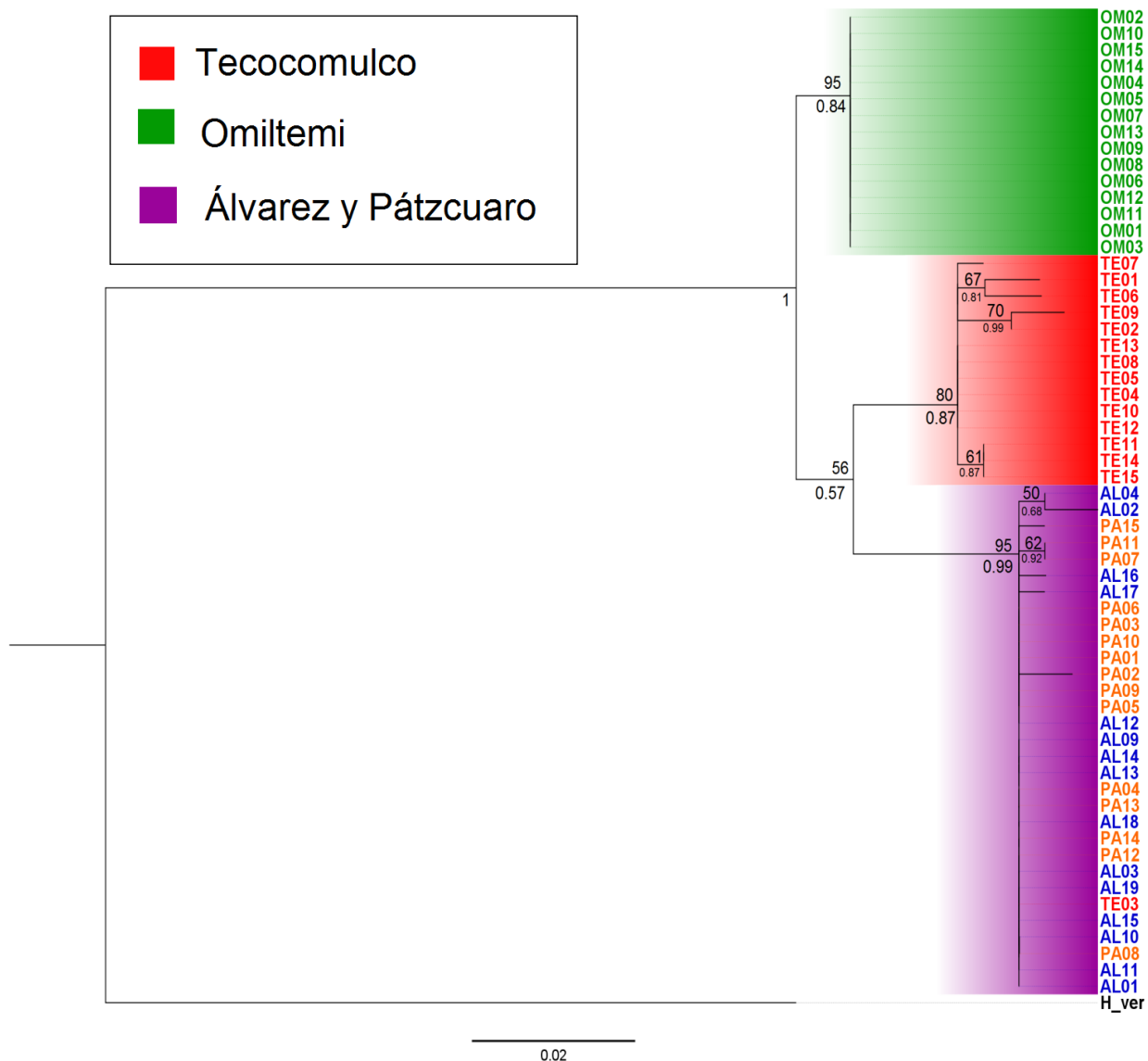


Figura 19. Árbol de consenso para el gen *Cyt b*. Los valores de la parte superior en los nodos indican el soporte de bootstrap, basado en 10 000 réplicas. Los números de la parte inferior indican el valor de la probabilidad posterior.

En el árbol del gen 16S del análisis de Inferencia Bayesiana (Figura 20) hay algunos cambios respecto a la inclusión de los individuos en los clados. Se observan tres clados: el primer clado corresponde a la población de Omiltemi pero no se observa como un grupo monofilético. El segundo clado corresponde a la población de Tecocomulco exceptuando el individuo TE03 con una probabilidad posterior de 0.699. El último clado corresponde a la población de Álvarez-Pátzcuaro, al individuo TE03 y a OM09 con una probabilidad posterior de 0.73.

En la topología resultante con el análisis de Máxima Verosimilitud para el gen 16S (Figura 21) se observaron valores de verosimilitud muy bajos y muy poca similitud con la estructura de los tres clados de los genes anteriores. El subclado de Álvarez-Pátzcuaro conserva su estructura, pero el clado de Tecocomulco queda dividido en dos partes sin una estructura clara. Por otro lado el clado de Omiltemi tampoco presenta una estructura clara y el individuo OM09 se encuentra separado de la población.

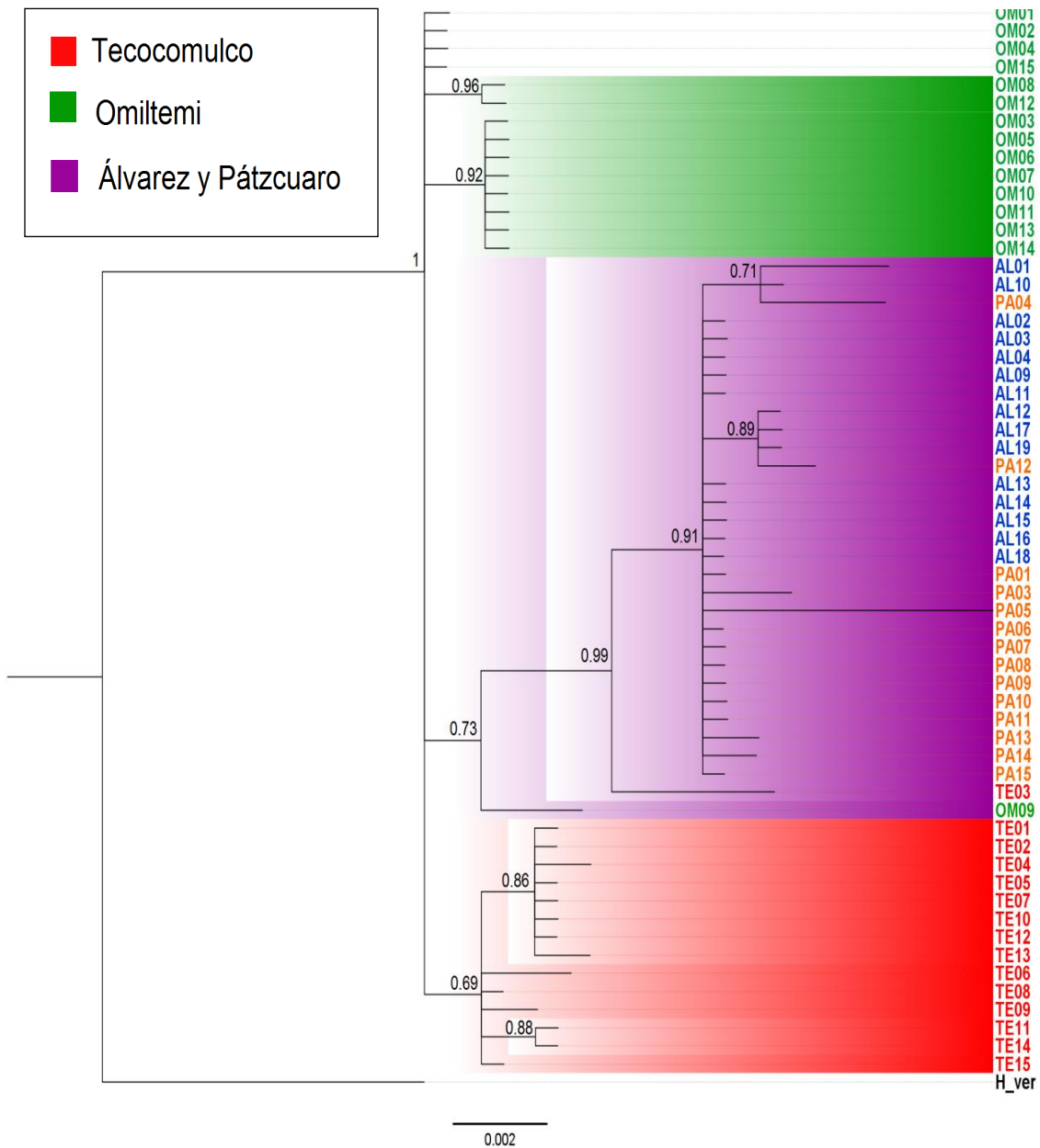


Figura 20. Árbol de Inferencia Bayesiana para el gen 16S. Los números indican el valor de la probabilidad posterior.

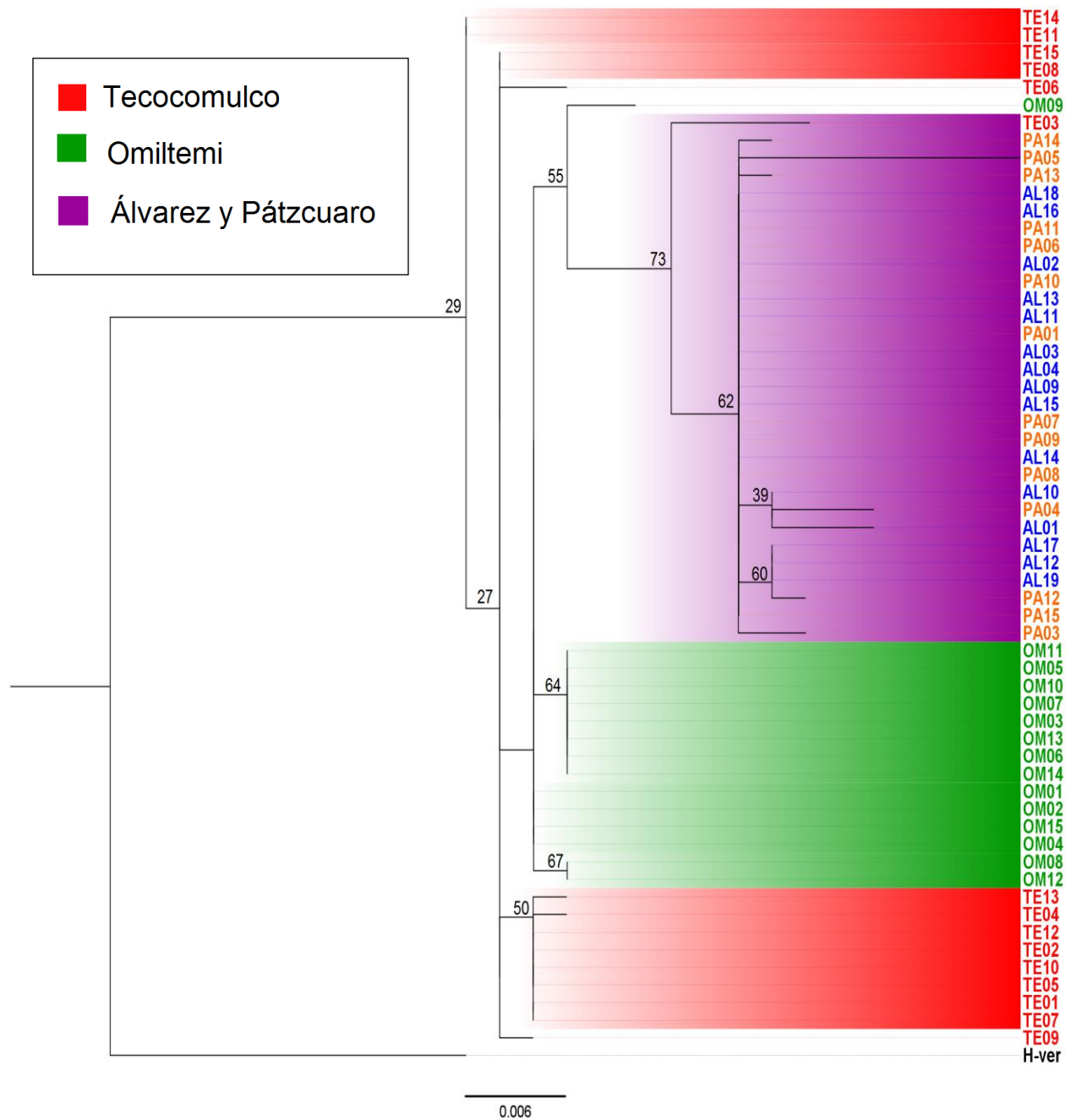


Figura 21. Árbol de Máxima Verosimilitud para el gen 16S. Los valores en los nodos indican el soporte de bootstrap, basado en 10 000 réplicas.



En el análisis con los genes concatenados se encuentran tres subclados concordantes con los tres haplogrupos en la red mínima (Figura 22). La topología de los genes ND4 y *Cyt b* se vuelve a reflejar en este análisis conjunto. Ambos análisis (Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana) resultaron concordantes por lo que se presentan estos resultados en un mismo árbol.

Se encontraron dos clados. En un clado se encuentra toda la población de Omiltemi con una probabilidad posterior de 0.99 y 96 de bootstrap. En este clado se encuentra un grupo de ocho individuos (OM03, OM05, OM06, OM07, OM10, OM11, OM13 y OM14) con una probabilidad posterior de 0.96 y 63 de bootstrap y un grupo pequeño de dos individuos (OM08 y OM12) con una probabilidad posterior de 1 y 88 de bootstrap. En el segundo clado se encontraron dos subclados con una probabilidad posterior de 0.66 y 55 de bootstrap. El primer subclado está conformado por la población de Tecocomulco, excepto el individuo TE03 con una probabilidad posterior de 1 y 86 de bootstrap. El segundo subclado lo conforman las poblaciones de Álvarez-Pátzcuaro con una probabilidad posterior de 1 y un bootstrap de 97. En este árbol el individuo TE03 se encuentra dentro del subclado de Álvarez-Pátzcuaro.

En el análisis de Inferencia Bayesiana con el gen ND4 y los individuos de Bryson *et. al.* (2014a) (Figura 23) se encuentran dos clados. El primer clado, con una probabilidad posterior de 1, formado por la población de Tecocomulco y el linaje de *eximia* OrS. El segundo clado, con una probabilidad posterior de 0.95, formado por 3 subclados: el primer subclado (con una probabilidad posterior de 0.99) compuesto por Álvarez-Pátzcuaro y el linaje *eximia* CMP., el segundo subclado (con una probabilidad posterior de 0.99) por la población de Omiltemi y los dos individuos *arboricola* y el tercer subclado (con una probabilidad posterior de 0.97) compuesto únicamente por el linaje OcS.

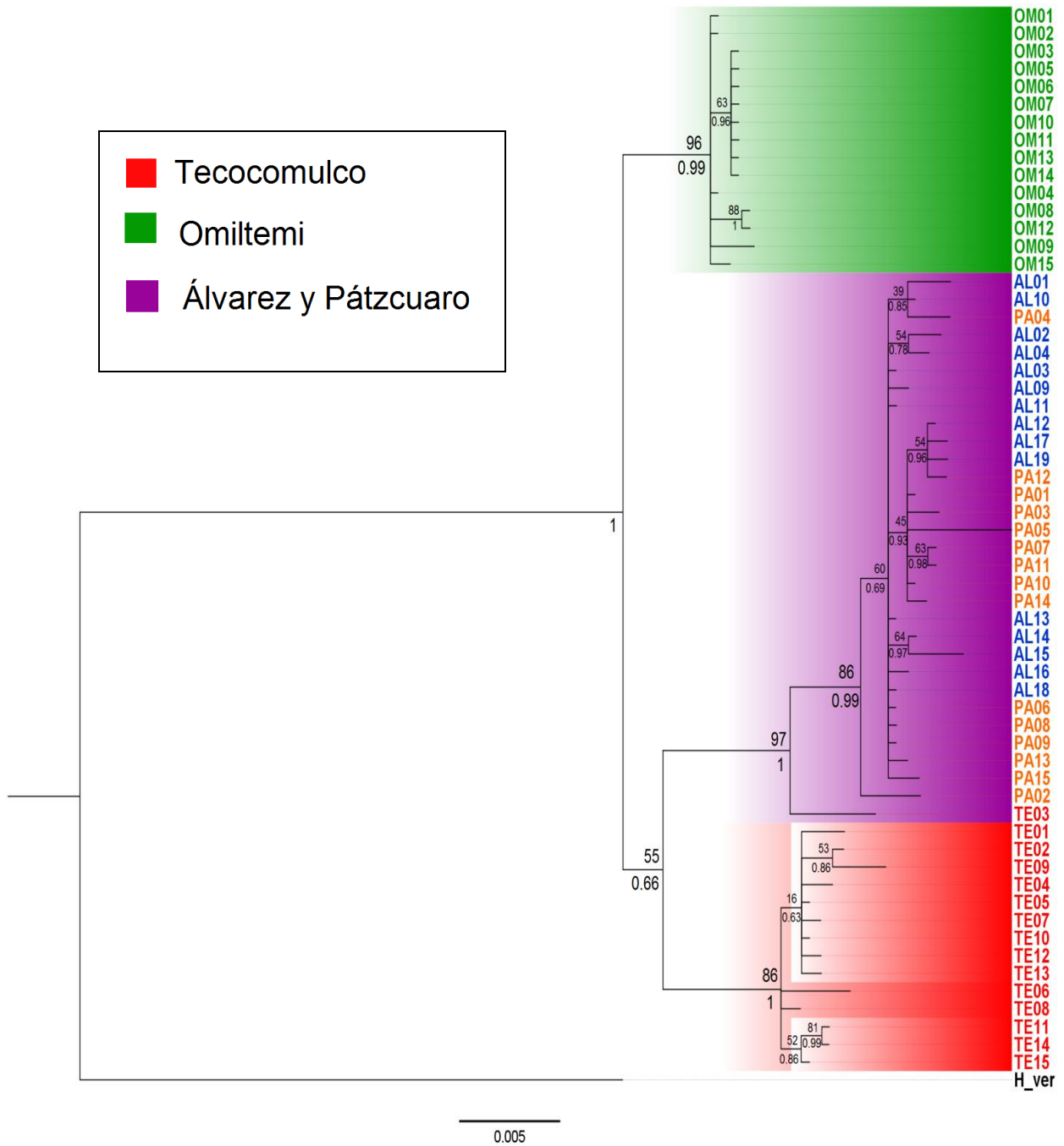


Figura 22. Árbol de consenso para la matriz concatenada. Los valores de la parte superior en los nodos indican el soporte de bootstrap, basado en 10 000 réplicas. Los números de la parte inferior indican el valor de la probabilidad posterior.

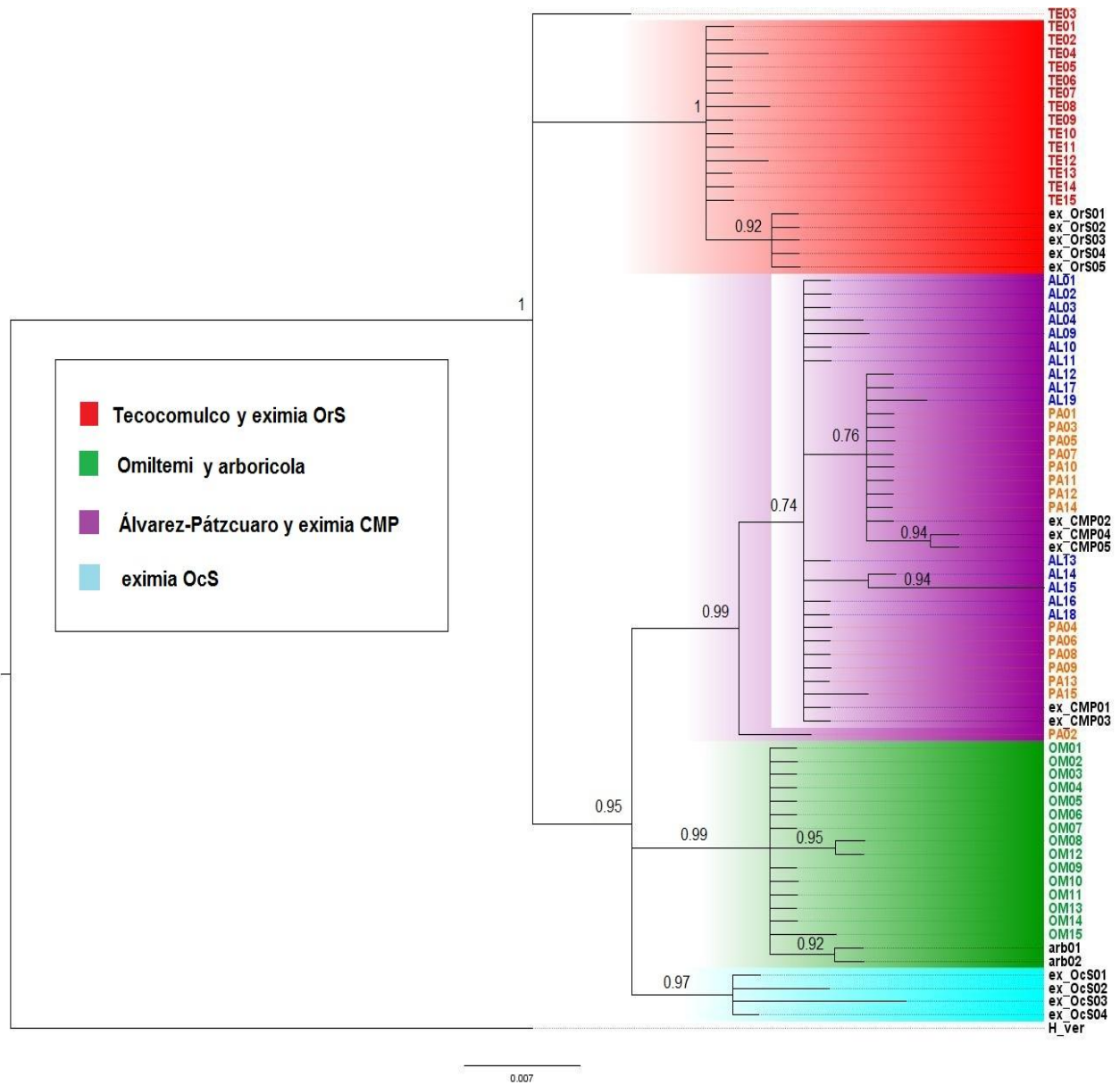


Figura 23. Árbol de Inferencia Bayesiana para el gen ND4 con los individuos *eximia* y *arboricola* de Bryson *et al.* (2014b). Los números indican el valor de la probabilidad posterior.

## 8.6 Distancias genéticas entre clados

Se obtuvieron valores de divergencia ( $D_{XY}$ ) de 0.03 (3%) en los clados de Álvarez-Pátzcuaro con Omiltemi, Álvarez-Pátzcuaro con Tecocomulco y Tecocomulco con Omiltemi (Cuadro 10). Para los valores de  $D_A$  en todos los clados se obtuvieron valores de 0.028 (2%). De acuerdo a las distancias genéticas, esto significa que existe diferencia suficiente para designar a la población de Omiltemi como una especie diferente (Fouquet *et al.*, 2007).

Cuadro 10. Distancias genéticas ( $D_{XY}$  y  $D_A$ ) entre clados. El índice  $D_{XY}$  indica el número promedio de sustituciones nucleotídicas por sitio entre poblaciones y el índice  $D_A$  el número de sustituciones nucleotídicas netas por sitio entre poblaciones.

Clado 1	Clado 2	$D_{XY}$ (Nei, 1987)	$D_A$ (Nei, 1987)
Álvarez/Pátzcuaro	Omiltemi	0.030	0.028
Álvarez/Pátzcuaro	Tecocomulco	0.033	0.028
Tecocomulco	Omiltemi	0.032	0.028

## 8.7 Red con *Dryophytes arboricola*

La red resultante de Splits Tree4 (Huson y Bryant, 2006) con el gen ND4 incluyó a los organismos de *D. arboricola* (arb01, arb02) de Bryson *et al.* (2014b) dentro del clado de Omiltemi. Los organismos del linaje *eximia* OrS se agruparon con el clado de Tecocomulco y el linaje *eximia* CMP en el clado de Álvarez-Pátzcuaro. El linaje *eximia* OcS no se agrupó con ningún clado pero se posicionó como hermano del clado de Omiltemi. Los valores de bootstrap de las ramas están estadísticamente soportados (Figura 24).

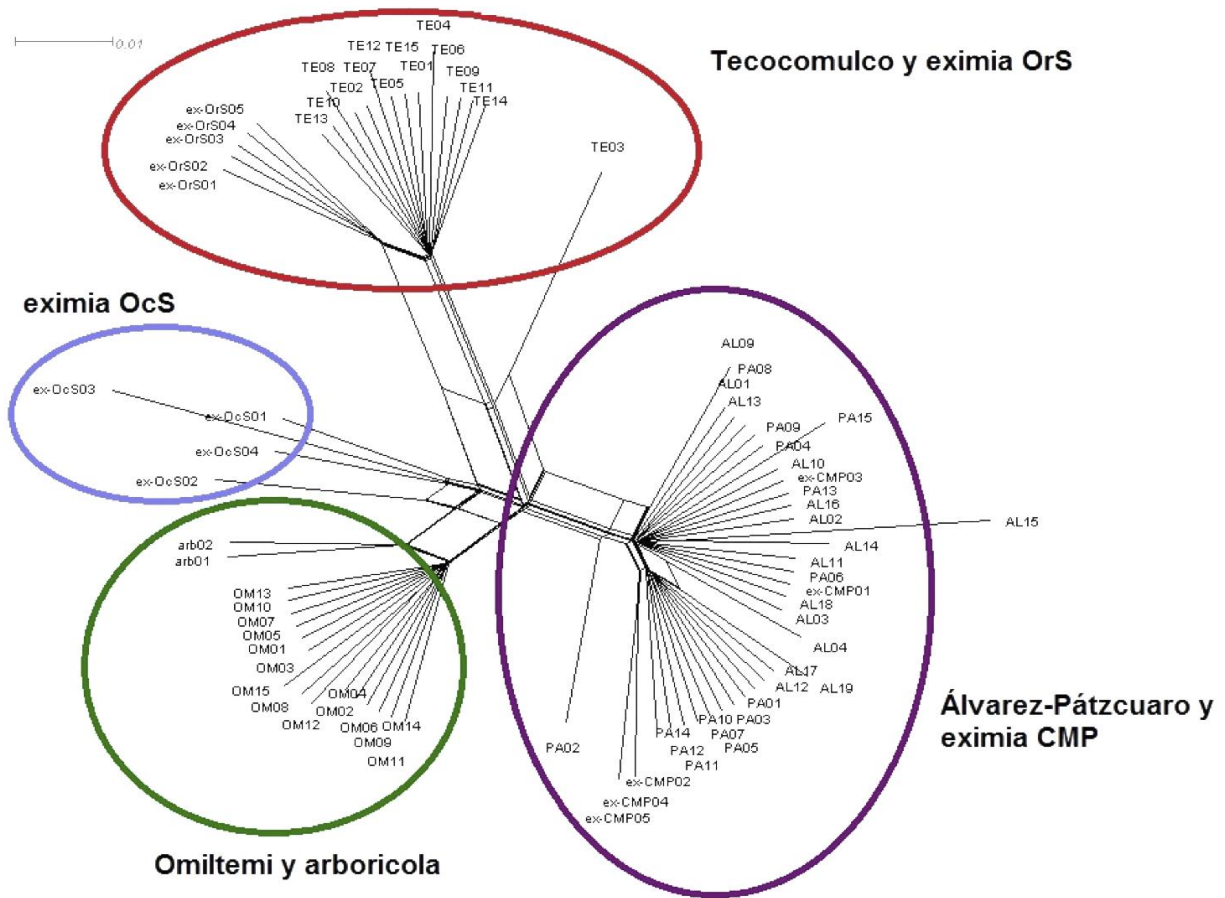


Figura 24. Red de *Dryophytes arboricola* y *D. eximius* con dos individuos de *D. arboricola* y tres linajes de *D. eximius* de Bryson *et al.* (2014b). Se observan los cuatro clados resultantes. Se implementó Neighbor Net, GTR y 100 réplicas de bootstrap.

## IX. DISCUSIÓN

Para conocer la diversidad entre poblaciones y poder establecer la existencia de flujo genético es importante incrementar el número de muestras para de cada una de ellas. Al incrementar el número de muestras por población se encontraron tres unidades genéticas independientes: Omiltemi, Tecocomulco y Pátzcuaro-Álvarez, llamada Altiplano Mexicano por Bryson *et al.* (2014a). Estas unidades fueron consistentes en los diferentes análisis llevados a cabo en el estudio, lo que sugiere una fuerte y marcada estructura genética dentro de las poblaciones de *Dryophytes eximius*, así como una diferenciación de *D. arboricola* fuera del clado *D. eximia*.

### 9.1 Diversidad genética de *Dryophytes arboricola* y *D. eximius*

En este estudio se encontró que existen diferencias entre la diversidad haplotípica y nucleotídica entre las poblaciones e incluso entre los genes. La diversidad haplotípica ( $h$ ) fue alta en todos los genes y en la mayoría de las poblaciones (0.7-0.9) mientras que los valores de diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) resultaron bajos (0.01-0.02) (Cuadro 3 a 6) indicando una baja diferenciación en la mayoría de los haplotipos (Rivera, 2016). Algo similar se observa en el estudio de Rodríguez-Tejeda *et al.* (2014) al trabajar con ocho poblaciones de *D. eximius* con dos genes mitocondriales (*Cyt b* y subunidades 8 y 6 de ATPasa) donde se encontraron niveles altos en la diversidad haplotípica en todas las poblaciones ( $h$  de 0.8 a 1); y niveles bajos en la diversidad nucleotídica ( $\pi$  de 0.022 a 0.077) en las subpoblaciones de Pánuco y Lerma. Explican que los altos valores de diversidad nucleotídica en las regiones de Magdalena y Balsas ( $\pi$  de 0.461 y 0.269) probablemente no son confiables, ya que las desviaciones estándar son altas debido a un número de muestra pequeño (2 y 3 individuos). En el presente estudio se usaron individuos suficientes por población para que no tener efectos del tamaño de muestra.

Los valores negativos y significativos para la  $F$  de Fu y Li, y la  $F_s$  de Fu han sido descritos para poblaciones bajo expansión poblacional (Ramos-Onsins y Rozas, 2002). Estos datos sugieren que para los valores del gen 16S, las poblaciones de *D. eximius* podrían estar en expansión.

En el gen ND4 se detectaron 17 haplotipos, en el gen *Cyt b* resultaron 16 haplotipos, en el marcador 16S fueron 21 haplotipos y en el análisis concatenado se obtuvieron 27 haplotipos. Mientras que con ND4 la mayor diversidad se encontró en la población de Álvarez, con los dos

genes restantes y el análisis concatenado la población con mayor diversidad fue Tecocomulco. En el gen ND4, *Cyt b* y el análisis concatenado la población menos diversa fue Omiltemi.

Como se esperaba la población de Omiltemi (*D. arboricola*) presentó los valores más bajos de diversidad haplotípica y nucleotídica de entre las cuatro poblaciones. Esto debido a que es una especie restringida geográficamente y de población pequeña.

## 9.2 Estructura y variación entre las poblaciones de *Dryophytes arboricola* y *D. eximius*

Los índices de  $F_{ST}$  pareados indican que las poblaciones más diferenciadas son Omiltemi y Tecocomulco. Las poblaciones que comparten más similitud son Álvarez-Pátzcuaro ( $F_{ST} = 0.117$ ), las que presentan mayor diferenciación son Omiltemi-Álvarez ( $F_{ST} = 0.834$ ) y Omiltemi-Pátzcuaro ( $F_{ST} = 0.838$ ). Las poblaciones de Omiltemi y Tecocomulco presentan suficiente diferenciación ( $F_{ST} = 0.709$ ) entre ellas para ser unidades poblacionales independientes. Valores muy parecidos ( $F_{ST}$  de 0.7 a 0.9) son encontrados en el trabajo de Rodríguez-Tejeda *et al.* (2014) donde los clados que más se diferencian uno del otro son el A y el D. Esto confirma su hipótesis acerca de las rutas de colonización de *D. eximius* donde el clado A es el clado basal y el clado D es el que se encuentra al final de la ruta.

El análisis de estructura poblacional implementado con el programa STRUCTURE indicó que el valor de agrupación genética máxima fue  $K = 3$  ( $-\ln = -493.85$ ), donde se observan tres grupos poblacionales. Álvarez-Pátzcuaro es una unidad genética y las poblaciones analizadas son pequeñas y mantienen restricción de flujo génico aun cuando son distantes geográficamente. La historia del ADN mitocondrial de las poblaciones indica que las poblaciones locales Álvarez-Pátzcuaro, Tecocomulco y Omiltemi son recíprocamente monofiléticas mostrando mucho menor diversidad dentro de las poblaciones que entre las poblaciones (Neigel y Avise, 1986; Avise, 1989).

En el análisis de varianza molecular (AMOVA) los valores de variación mayores se obtuvieron entre las regiones Álvarez-Pátzcuaro, Omiltemi y Tecocomulco (70.73%; Cuadro 9). Estos resultados coinciden con el valor del índice de  $\Phi_{iST} = 0.742$  obtenido, también indican una fuerte estructura genética poblacional, al haber mayor variación entre las poblaciones que dentro de ellas. Barber (1999b) al trabajar con secuencias de *Cyt b* de *D. arenicolor* encontró valores muy similares de AMOVA entre sus tres clados resultantes (60.4-78.9% entre regiones y 13.9-30.1% entre las poblaciones). Las poblaciones estudiadas no tienen contacto geográfico pero

mantiene niveles moderados de flujo génico dentro de las regiones. Barber (1999b) sugiere que los orígenes de la estructura filogeográfica no son simplemente el resultado de la extinción de poblaciones intermedias en un taxón con dispersión limitada, sino que hay o han habido barreras que evitaron el movimiento entre estas regiones geográficas resultando en la estructura filogeográfica observada.

En la hipótesis del presente trabajo se esperaba encontrar una estructura poblacional que diferenciara a la primera especie (*Dryophytes arboricola*) plenamente de la segunda (*D. eximius*) de acuerdo a la diferenciación encontrada en los estudios de cantos (Elios, 2001; Carrillo, 2009). Es decir, se esperaban encontrar dos grupos genéticos, uno conformado por las poblaciones de Álvarez, Pátzcuaro y Tecocomulco, y el otro por Omiltemi solo. Sin embargo, se encontraron tres grupos donde Tecocomulco es también una unidad genética.

### **9.3 Inferencia filogenética entre *Dryophytes arboricola* y *D. eximius***

Contrario a lo esperado la población de Tecocomulco se separa del haplogrupo Pátzcuaro-Álvarez, al suponerse que las tres poblaciones se mantendrían juntas para conformar el grupo *Dryophytes eximius*, separado de *D. arboricola*. Pero como se esperaba, Omiltemi es claramente un haplogrupo independiente. En las cuatro redes se observó una estructura y acomodo muy similar respecto a los haplogrupos. Sin embargo, como el número de haplotipos dentro de las poblaciones aumenta conforme aumentan los cambios mutacionales, la población de Omiltemi es la que presentó el menor número de haplotipos y por ende menor número de mutaciones dentro de su población. El gen donde se observó el menor número de haplotipos fue *Cyt b* (16 haplotipos), luego ND4 (17 haplotipos), 16S (21 haplotipos) y por último la matriz concatenada (27 haplotipos).

Con la excepción del gen 16S, en los análisis de inferencia filogenética se generaron topologías altamente concordantes entre los genes y el análisis concatenado así como en los dos métodos de análisis. En todos los árboles se soportaron tres clados diferentes: 1) El clado que incluye a las poblaciones de Álvarez y Pátzcuaro; 2) la población de Omiltemi; y, 3) la población de Tecocomulco. La posición de la población de Omiltemi y Tecocomulco varían en los resultados. ND4 sugiere que Tecocomulco es hermano Omiltemi + Álvarez-Pátzcuaro, mientras que *Cyt b* y el concatenado indican que Omiltemi es hermano de Tecocomulco + Álvarez-Pátzcuaro. El gen 16S no muestra una solución con respecto a la posición de Omiltemi y



Tecocomulco. El trabajo de Barber (1999a) con *Dryophytes arenicolor* muestra un patrón similar con el del presente trabajo, en el cual los tres linajes tienen una fuerte estructura filogeográfica.

Para el individuo TE03 no se encuentra clara su posición ya que tiende a agruparse de manera distinta en los diferentes análisis. Este mismo individuo es el que tiene identidad genética compartida con el grupo Álvarez-Pátzcuaro en el análisis de STRUCTURE (Figura 12). Este caso y el ejemplar OM09 (en menor grado) en Omiltemi son la única evidencia verdadera de introgresión observada en el estudio. A excepción del clado de Tecocomulco, en los clados se observa un soporte fuerte de bootstrap ( $> 95$ ), así como de probabilidad posterior ( $> 0.99$ ). El bootstrap fue introducido para obtener estimados de error en situaciones no estándares por medio de remuestreos en conjuntos de datos para proveer una distribución en contra de la cual las hipótesis podrían ser probadas (Efron, 1979; Soltis y Soltis, 2003). De acuerdo a Felsenstein (1985), que maneja los valores de bootstrap como medidas de repetibilidad y no como medidas de exactitud, un valor de bootstrap igual o mayor que 95% es estadísticamente significativo e indica soporte para un clado. Para Hillis y Bull (1993) un valor de bootstrap arriba del 70% usualmente corresponde al clado real.

Frecuentemente, las poblaciones que abarcan un área de distribución grande presentan en la topología del árbol filogenético, ramas altamente diferenciadas entre las poblaciones. La diferenciación genética entre Omiltemi y Tecocomulco con las demás poblaciones se pudo deber a la separación de estas ramas por barreras biogeográficas a largo plazo que no permitió el flujo génico, lo que ocasionó la acumulación de diferencias entre haplotipos excediendo las observadas dentro de las poblaciones locales (Avice, 1989). Otra posible explicación es la extinción de genotipos intermedios en el rango de distribución de la especie con dispersión y flujo génico limitados. Por el contrario, las poblaciones de Álvarez y Pátzcuaro se mantienen cohesivas en una unidad genética intermezclada, y a pesar de la distancia, el flujo génico persiste a través de las distintas poblaciones del Altiplano Mexicano (Bryson *et al.*, 2014a).

Bryson *et al.* (2014a) analizan los efectos de la introgresión de genes en los linajes filogeográficos de Hylidae. Dentro de la especie *D. eximius* se formaron cuatro linajes bien delimitados geográficamente (Figura 4): *eximia* DGO (individuos de Durango), *eximia* CMP (individuos de la Altiplanicie Mexicana), *eximia* OrS (individuos del sudeste de la Sierra Madre Oriental) y *eximia* OcS (individuos del sudeste de la Sierra Madre Occidental). En la inferencia Bayesiana y la red de Splits Tree incluyendo a las secuencias de Bryson *et al.* (2014a), el análisis

aquí presentado, el linaje *eximia* OrS se agrupa al clado de Tecocomulco, el linaje *eximia* CMP es asignado al clado de Álvarez-Pátzcuaro, los dos individuos de *D. arboricola* se encuentran dentro del clado de Omiltemi, y el linaje *eximia* OcS como un clado independiente. Estos últimos tres clados como grupos hermanos, a diferencia de Bryson *et al.* (2014a) donde *eximia* CMP es grupo hermano de *eximia* OcS y *eximia* OrS es grupo hermano de *arboricola*. Es decir, hay una discordancia en los resultados entre Bryson *et al.* (2014a) y el presente estudio. Sin embargo, hay que recordar que solo se pudo comparar con ese estudio el gen mitocondrial ND4 y que los resultados de Bryson *et al.* (2014a) también incluyen los genes NADH subunidad 4 + ATP 8 y 6 con un total de 1598 pb y genes nucleares. La información mitocondrial y nuclear que encontraron fue discordante evidenciando introgresión en el grupo de *D. eximius* (Figura 4 y 5). Los autores se basaron en el árbol de especies con genes nucleares al tener mayor soporte que el mitocondrial. En el árbol todas las especies de *D. eximius* forman un clado y otro de los clados lo constituyen las especies de *D. arboricola*, *D. euphorbiacea* y *D. plicata*.

#### **9.4 Distancias genéticas entre las poblaciones de *D. arboricola* y *D. eximius***

El grado de divergencia genética es usado como indicador de que un conjunto de poblaciones pertenecen a especies diferentes o que varias poblaciones pertenecen a una sola especie. La distancia genética representa el grado de disimilitud entre dos o más composiciones genéticas de individuos (Ferguson, 2002).

Los valores de distancia genética derivados a partir del Índice de Identidad de Nei (Nei, 1972) entre especies estrechamente relacionadas presentan frecuentemente valores de 0.1 (10%). El índice de Nei indica el número promedio de sustituciones nucleotídicas por sitio entre poblaciones. A consecuencia de esto, se han agrupado especies en una sola por presentar un bajo valor de distancia genética; así como dividido una especie en varias por presentar valores altos (Ferguson, 2002).

En el estudio de Barber (1999a) los valores de divergencia entre secuencias ( $D_{XY}$ ) resultaron mucho más altos que los obtenidos en este, donde entre las poblaciones los valores van de 0 a 13.7% y el clado tres se cree que está más relacionado con las especie de *D. eximius* que usaron como grupo externo, indicando que *D. arenicolor* no tiene un linaje monofilético.

En el estudio de Gergus *et al.* (2004) al comparar seis poblaciones de *D. wrightorum* contra una población de la Ciudad de México de *D. eximius* por medio de *Cyt b*, encontraron dos

haplotipos para *D. eximius* y siete para *D. wrightorum* donde el número de sustituciones entre las especies fue de 35. Se encontró divergencia respecto a la distancia genética de 0.00 a 0.07 (0-7%) entre las poblaciones de *D. wrightorum* y de 0.4 a 0.6 (40-60%) entre las especies de *D. eximius* e *D. wrightorum*. Esta alta divergencia entre las poblaciones de las dos especies soporta la relativa independencia evolutiva entre estos dos linajes y se sugiere que la especiación entre ellas se dio por aislamiento geográfico (especies alopátricas). Valores muy altos de divergencia genética marcan la separación contundente entre especies, mientras que valores bajos (como es el caso de este trabajo) solamente podrían indicar la estructuración y divergencia entre las poblaciones de una misma especie.

De acuerdo a Fouquet *et al.* (2007), basado en análisis de aislamiento por distancia, un valor de distancia genética igual alrededor de 0.03 (3%) podría ayudar a identificar candidatos de especies en anfibios, específicamente en anuros Neotropicales. Siguiendo este razonamiento los clados de Omiltemi y Tecocomulco ( $D_{XY} = 0.030$  y  $0.033$  respectivamente) representarían especies diferentes al clado Álvarez-Pátzcuaro, e incluso entre ellos ( $D_{XY} = 0.032$ ).

Sin embargo, así como la divergencia genética entre dos poblaciones aisladas toma lugar gradualmente, se esperaría, en una escala de tiempo ecológica, que la especiación tomaría mucho tiempo. Un gran número de eventos de especiación se dieron hace cuatro millones de años y la mayoría de estos eventos pudieron haber ocurrido antes del Pleistoceno (Ferguson, 2002).

Avise *et al.* (1998) sobre tiempos de especiación en vertebrados, encontraron para los grupos de herpetofauna y peces un porcentaje del 25% de divergencia genética mayor en las poblaciones de una misma especie (filogrupos) que entre comparaciones de especies hermanas. Esto indica una gran diferenciación genética entre los filogrupos a través de periodos largos, pero sin presentarse algún evento de especiación entre ellos. El aislamiento genético entre dos poblaciones no es prueba suficiente para separar una especie de otra, también deben ser considerados los cambios ecológicos y/o de comportamiento en los organismos (Ferguson, 2002).

### **9.5 *Dryophytes arboricola* y *D. eximius***

En 1941 Taylor describió a la especie *D. arboricola* en los alrededores de Omiltemi, Guerrero diferenciándola de *D. eximius* por tener una cabeza más ancha, la membrana interdigital más extendida, extremidades sin marcas oscuras, así como por carecer de una marca oscura bien definida a los lados de la cabeza. Debido a su gran diversidad y alto número de especies

endémicas, Omiltemi fue por más de un siglo la localidad tipo para muchas especies de flora y fauna en México. Omiltemi es un mosaico donde se encuentran elementos de varios orígenes de distintas edades, ya que la importancia de su riqueza en especies endémicas no solo radica en la cantidad, sino que éstas constituyen una interesante mezcla biogeográfica (Luna y Llorente, 1993).

En 1970 Duellman sinonimiza la especie con *D. eximius* pero Eliosa (2001) por medio de análisis acústicos la vuelve a separar como *D. arboricola*. En el trabajo de Carrillo (2009), que es antecedente de esta investigación, se reconoce durante todo el trabajo como población de la especie *D. eximius* pero encontró diferencias importantes poblacionales en el canto de las ranas de Omiltemi. Actualmente *D. arboricola* se considera una especie válida restringida al estado de Guerrero (Omiltemi); sin embargo, no se habían hecho estudios de genética poblacional de la especie para establecer su unidad genética. Este trabajo constituye el primer estudio de genética poblacional de la población de Omiltemi.

Desde 1970 Duellman reconoce la posibilidad de que el taxón *D. eximius* pudiera estar formado por más de una especie. Ahora se sabe que las especies que conforman el complejo *Dryophytes eximius* comparten características tanto morfológicas como ecológicas; sin embargo, cada especie mantiene su identidad y no constituyen una sola especie.

De acuerdo a Bryson *et al.* (2014a) la prueba de hibridación sugiere que *D. arboricola* y *eximia* OrS tuvieron una historia de hibridación que provee evidencia de una reciente conexión de estas dos regiones por medio de corredores efímeros de bosques pino-encino durante el Pleistoceno. A pesar de que en el árbol del presente trabajo *D. arboricola* y *eximia* OrS no se comportan como grupos hermanos, en los resultados de las pruebas de  $F_{ST}$  entre Omiltemi y Tecocomulco existe suficiente diferenciación ( $F_{ST} = 0.709$ ) para ser unidades poblacionales independientes y no se encontró introgresión importante entre ambas poblaciones. Hay que tomar en cuenta que no se trabajó con los genes nucleares para hacer la comparación correspondiente.

## **9.6 Cantos de *Dryophytes arboricola* y *D. eximius***

La variación intraespecífica en los atributos de los cantos de anuncio de los grupos de *D. eximius* y *D. arenicolor* es común (Blair, 1960) pero su origen y significado biológico aún no está

del todo entendido (Rodríguez-Tejeda *et al.*, 2014). Incluso Duellman (1970, 2001) sugiere que *D. eximius* carece de un canto típico de la especie.

De acuerdo a Carrillo (2009) las poblaciones de Álvarez, Pátzcuaro y Tecocomulco están en un grupo diferente a la de Omiltemi; las variables de frecuencia dominante y número de pulsos son estáticas para las primeras tres poblaciones. Para Omiltemi las propiedades que resultan estáticas son la duración del canto y la frecuencia secundaria (Figura 25).

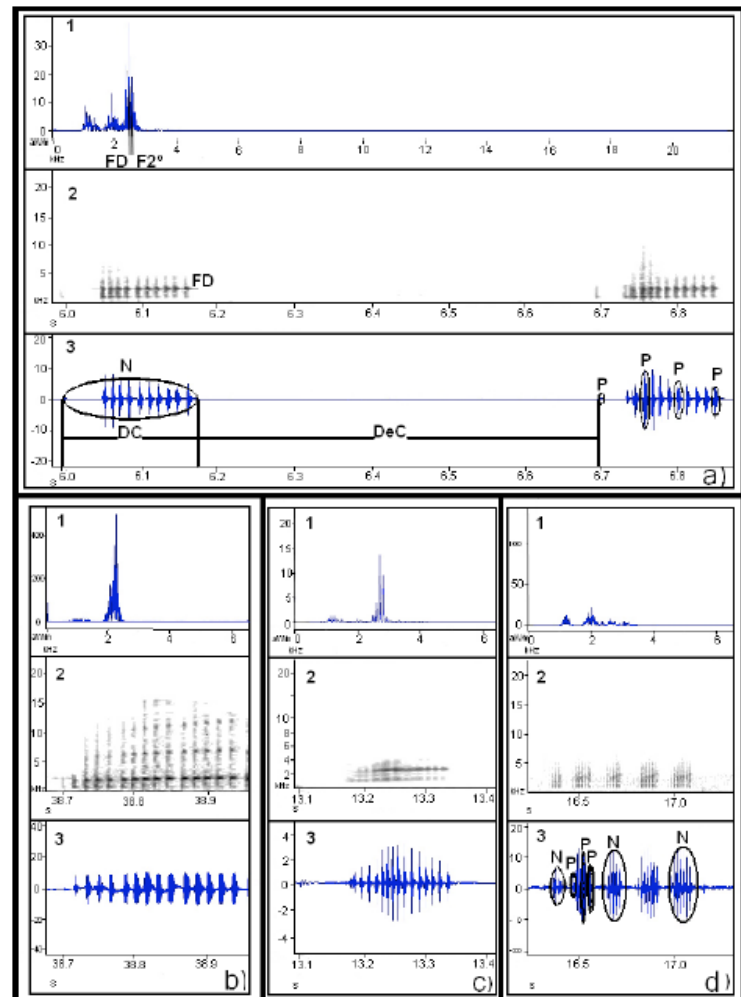


Figura 25. Sonogramas para las poblaciones de: a) Álvarez, b) Tecocomulco, c) Pátzcuaro y d) Omiltemi (1= espectrograma, 2= espectro y 3= oscilograma) (Carrillo, 2009).

La imagen del análisis de las variables de los cantos muestra dos grupos bien definidos, el primero que incluye a las tres poblaciones antes mencionadas con una distribución clinal para los dos factores y sin solapamientos en sus valores. Pátzcuaro presenta valores positivos altos para

los dos componentes, Álvarez con valores negativos bajos para el primer factor y valores positivos para el segundo y Tecocomulco con valores negativos para los dos factores. El segundo grupo representado por individuos todos de Omiltemi con valores positivos para el primer factor y negativos para el segundo (Figura 26).

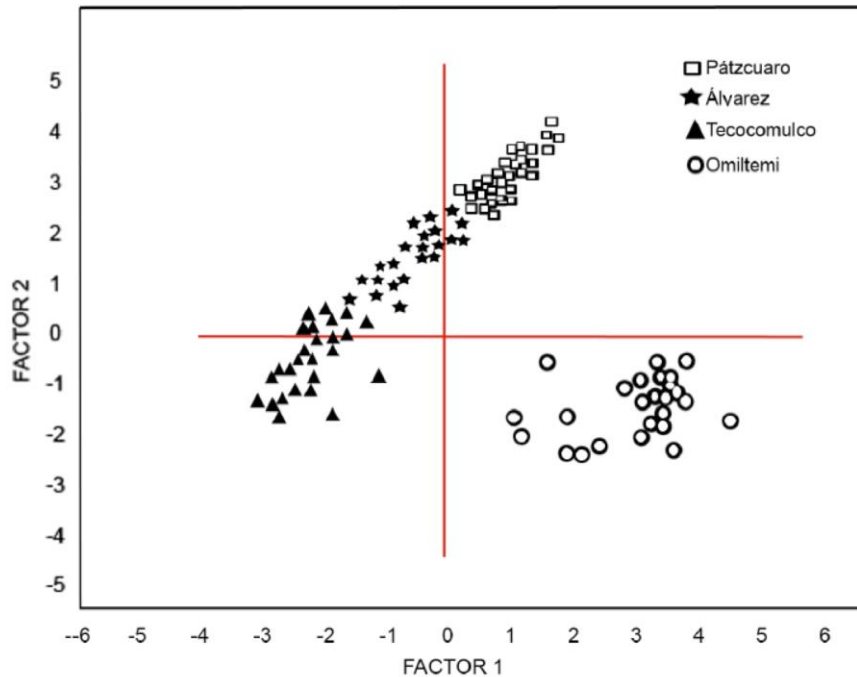


Figura 26. Gráfico del análisis de Componentes Principales de los cantos (Carrillo, 2009).

Si comparamos el árbol filogenético del análisis concatenado con el gráfico de Componentes Principales se puede ver la misma separación de dos grupos: Omiltemi representando a uno y las otras tres poblaciones representando al otro. Esto quiere decir que si hay una relación entre los cantos y la estructura genética a simple vista. Omiltemi tiene un canto muy diferente respecto a las otras poblaciones que lo hacen formar un grupo independiente.

### 9.7 ¿Es *Dryophytes arboricola* una especie diferente a *D. eximius*?

El concepto de especie cohesiva de Templeton (1989) dice que las especies corresponden a grupos de individuos que conservan su similitud morfológica, ecológica, genética, etológica y de historia de vida, a través del flujo genético que ocurre entre ellos. Nuestros resultados de los análisis Bayesiano y de Máxima Verosimilitud con datos concatenados indican que las poblaciones genéticas de Álvarez y Pátzcuaro definen claramente un grupo monofilético

plenamente distinguible e intermezclado y que corresponde a la especie *Dryophytes eximius*, concordando con la evidencia morfológica. Genéticamente Álvarez y Pátzcuaro son las poblaciones que tienen menor diferenciación de acuerdo a los índices  $F_{ST}$  y el análisis de Structure ( $K = 3$ ) muestra que son un grupo genético diferente a Tecocomulco por un lado y a Omiltemi por el otro. El porcentaje de variación entre las regiones de Álvarez-Pátzcuaro, Tecocomulco y Omiltemi tienen una fuerte estructuración (porcentaje de variación genética entre regiones = 70.73;  $p = 0.16401$ ), lo que apoya la separación entre ellas.

Los datos genéticos apuntan que la población de Omiltemi es una especie distinta debido a que estructuralmente la conforma un clado diferente en los árboles filogenéticos, las redes de haplotipos y la red de Splitstree. La probabilidad posterior (0.99) y el valor de Bootstrap (96) en los árboles filogenéticos la definen plenamente como un clado fuertemente soportado. Las distancias de Nei Dxy (Nei, 1987) con respecto a los demás taxones tiene mas del 3% de diferencia que según Fouquet *et al.* (2007) es suficiente para designarla como una especie diferente. Adicionalmente esta especie tiene caracteres morfológicos descritos previamente que la distinguen plenamente de *D. eximius* y los patrones de canto, son completamente distintos con esta especie (Eliosa, 2004; Carrillo 2009). Toda esta evidencia nos indica que *D. arboricola* es una especie genéticamente, morfológicamente, geográficamente y conductualmente cohesiva y diferente a las demás, de acuerdo al concepto de especie de Templeton (1989).

Sin embargo, no podemos decir lo mismo de la población de Tecocomulco cuyo clado deriva en la base de *D. eximius* representado por la población de Álvarez y Pátzcuaro. Al igual que Omiltemi cumple con todas las características genéticas para ser considerada una entidad independiente, pero no cumple con los demás requisitos de cohesividad de Templeton (1989) en los que la morfología es idéntica a la de *D. eximius*, los cantos no se diferencian plenamente con esta especie, y se distribuyen en la misma región geográfica. Esto significa que la población de Tecocomulco, debe seguir siendo considerada parte de la especie *D. eximius*, en la que sólo se cumple uno de los requerimientos de cohesividad. La localidad tipo de *D. eximius* es Coyoacán, Ciudad de México, muy cercana a Tecocomulco y le correspondería el nombre *D. eximius*.

## X. CONCLUSIONES

La diversidad haplotípica ( $h$ ) de la especie es alta en todos los genes y en la mayoría de las poblaciones mientras que los valores de diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) son bajos indicando baja diferenciación en la mayoría de los haplotipos. Omiltemi representó la población con menores índices de diversidad.

Los análisis de estructuración poblacional sugieren una fuerte y marcada estructura genética entre las poblaciones presentando mayor variación que dentro de ellas. Hay una buena estructura poblacional en los resultados de este trabajo.

En los análisis de inferencia filogenética se generaron topologías altamente concordantes entre los genes y el análisis concatenado. Los individuos se agruparon en tres clados: el primer clado incluyó a las poblaciones de Álvarez y Pátzcuaro, el segundo contuvo a Omiltemi y el tercero a la población de Tecocomulco.

Hay una relación positiva entre los cantos y la estructura genética entre las especies de *Dryophytes arboricola* y *D. eximius*.

La población de Omiltemi corresponde a la especie *Dryophytes arboricola* de acuerdo con el concepto de especie cohesiva de Templeton (1989) en el que la estructura genética esta de acuerdo con la evidencia del análisis de cantos de Carrillo (2009) y la evidencia morfológica. Este trabajo constituye el primer estudio de genética poblacional de la población de Omiltemi (*D. arboricola*).



## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Allan, S. E. y Simmons, A. M.** 1994. Temporal features mediating call recognition in the Green treefrog, *Hyla cinerea*: Amplitude modulation. *Animal behavior*, 47: 1073-1086.
- AmphibiaWeb.** 2018. Family Hylidae, <http://www.amphibiaweb.org/> (Consultado el 24 de Enero del 2018).
- Arnheim, N., Krystal, M., Schmickel, R., Wilson, G., Ryder, O. y Zimmer, E.** 1980. Molecular evidence for genetic exchanges among ribosomal genes on non homologous chromosomes in man and ape. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77: 7323-7327.
- Avise, C. J., Arnold, R., Ball, M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C. A. y Saunders, N.C.** 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 18: 489-522.
- Avise, C. J.** 1989. Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. *Evolution*, 43 1192-1208.
- Avise, C. J.** 1994. *Molecular markers, natural history and evolution.* Springer Science and Business Media.
- Avise, C. J.** 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology*, 7: 371-379.
- Avise, C. J., Walker D. y Johns G. C.** 1998. Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 265: 1707-1712.
- Baird, S. F.** 1854. Descriptions of new genera and species of North American frogs. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 7:59–62.
- Barber, P. H.** 1999a. Phylogeography of the canyon tree frog, *Hyla arenicolor* (Cope) based on mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Ecology*, 8: 547-562.
- Barber, P. H.** 1999b. Patterns of gene flow and population genetic structure in the canyon treefrog, *Hyla arenicolor* (Cope). *Molecular Ecology*, 8: 563-576.
- Bandelt, H. J., Forster, P. y Röhl, A.** 1999. Median- joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37-48.

- Blair**, W. F. 1960. Mating calls as evidence of relations in the *Hyla eximia* group. The Southwestern Naturalist, 5(3): 129-135.
- Bryson**, R. W., Smith, B. T., Nieto-Montes de Oca, A., García-Vázquez, U. O. y Riddle, B. R. 2014a. The role of mitochondrial introgression in eliminating the evolutionary history of Neartic frogs. Zoological Journal of the Linnean Society, 172: 106-116.
- Bryson**, R. W., Smith, B. T., Nieto-Montes de Oca, A., García-Vázquez, U. O. y Riddle, B. R. 2014b. Data from: The role of mitochondrial introgression in eliminating the evolutionary history of Neartic frogs. Dryad Digital Repository.
- Bush**, G. L. 1994. Sympatric speciation in animals: new wine in old bottles. Trends in Ecology and Evolution, 9: 285- 288.
- Carranza**, S. 2002. Los métodos moleculares en el estudio de la sistemática y filogenia de los anfibios y reptiles ibéricos. Págs. 551-579 en (Pleguezuelos, J. M., Márquez, R. y Lizana M., eds.) Atlas y libro rojo de los anfibios y reptiles de España, Dirección General de Conservación de la Naturaleza-Asociación Herpetológica Española (segunda impresión). Madrid, España.
- Carrillo**, M. A. I. 2009. Comparación de los parámetros cuantitativos de los cantos de anuncio entre cuatro poblaciones de *Hyla eximia* (Anura: Hylidae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F. 38 pp.
- Castresana**, J. 2001. Cytochrome *b* Phylogeny and the taxonomy of great apes and mammals. Molecular Biology and Evolution, 18(4):465-471.
- Cerritos**, F. R. 2007. Capítulo 10: La especie como unidad evolutiva: uso de marcadores moleculares para su reconocimiento y delimitación, con especial énfasis en microorganismos. Págs 325-349 en (Eguiarte, L., Souza, V. y Aguirre X., eds.) Ecología molecular. Instituto Nacional de Ecología. México, D. F.
- Check**, A., Loughheed, S., Bogart, P. y Boag, P. 2001. Perception and history: Molecular phylogeny of a diverse group of neotropical frogs, the 30-chromosome *Hyla* (Anura: Hylidae). Molecular phylogenetics and evolution, 18: 370-385.
- Duellman**, W. E. 1970. Hylid frogs of Middle America. Monograph Museum Natural History of Kansas, 1: 1-753.
- Duellman**, W. E. 2001. Hylid frogs of Middle America. Society for the Study of Amphibians and Reptiles. Ithaca, Nueva York.

- Duellman**, W. E. Marion, A. B. y Hedges, S. B. 2016. Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). *Zootaxa*, 4104(1), 1-109.
- Earl**, D.A. y VonHoldt, B.M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2): 359–361.
- Edgar**, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5): 1792-1797.
- Efron**, B. 1979. Bootstrap methods: another look at the jackknife. *Annals of Statistics*, 7:1-26.
- Eliosa**, L. H. R. 2001. Variación geográfica en *Hyla eximia* (Anura: Hylidae). Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F. 50 pp.
- Esposti**, D. M., De Vries, S., Crimi, M., Ghelli, A., Patarnello, T. y Meyer, A. 1993. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1143: 243-271.
- Excoffier**, L. Smouse, P. E. y Quattro, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics Society of America*, 131: 479-491.
- Excoffier**, L., Laval, S. Schenider. 2005. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- Faivovich**, J., Haddad, C. F. B., Garcia, P. C. A., Frost, D. R., Campbell, J. A. y Wheeler, W. C. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hyliinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 294: 1–240.
- Farias**, I. P., Ortí, G., Sampaio, I., Schneider, H. y Meyer, A. 2001. The cytochrome b gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. *Journal of Molecular Evolution*, 53: 89-103.
- Felsenstein**, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- Ferguson**, J. W. H. 2002. On the use of genetic divergence for identifying species. *Biological Journal of the Linnean Society*, 75:509-516.

- 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 Analysis. PLoS ONE, 2(10): e1109.
- Frankham, R., Ballou, J. D. y Briscoe, D. A.** 2004. Resolving taxonomic uncertainties and defining management units: What is a species? Págs.104-114, en, (Frankham, R., Ballou, J. D. y Briscoe eds.) A primer of Conservation Genetics. Cambridge University Press
- Fu, Y. y Li, W.** 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. Genetics, 133: 693-709.
- Fu, Y.** 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics, 147: 915-925.
- Futyma, D. J.** 2005. What are species? Págs. 353- 358,en, (Futyma, D. J. eds.) Evolution. Sinauer Associates, Inc Publishers. Massachusetts, E. U. A.
- Gergus, E. W. A., Reeder, T. W. y Sullivan, B. K.** 2004. Geographic variation in *Hyla wrightorum*: advertisement calls, allozymes, mtDNA and morphology. American Society of Ichthyologists and Herpetologists. Copeia, 4:758-769.
- Gerhardt, H. C.** 1987. Evolutionary and neurobiological implication of selective phonotaxis in the green treefrog (*Hyla cinerea*). Animal Behavior, 35: 1479-1489.
- Gerhardt, H. C.** 1994. The evolution of vocalization in frogs and toads. Annual Review of Ecology and Systematics, 25:293-324.
- Gerhardt, H. C. y F. Huber,** 2002. Acoustic communication in insects and anurans: Common problems and diverse solution. The University of Chicago Press.
- Gillespie, J. H.** 2004. Population genetics: a concise guide. The John Hopkins University Press. E. U. A., 223 pp.
- Giraldo, P. A., Uribe, S. A. y López, A.** 2011. Análisis de secuencias de ADN mitocondrial (Cytb y ND1) en *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae). Revista Colombiana de Entomología, 37(2): 273-278.
- Gissi, C., Iannelli, F. y Pesole, G.** 2008. Evolution of the mitochondrial genome of metazoa as exemplified by comparison of congenetic species. Heredity, 101: 301-302.
- Griffiths, A. J., W. M. Gelbart, J. H. Miller, R. C. Lewontin.** 2004. Genética Moderna. McGraw Hill Interamericana. España, 676 pp.
- Gvozdík, V., Moravec, J., Klutch, C. y Kotlík, P.** 2010. Phylogeography of the Middle Eastern tree frogs (*Hyla*, Hylidae, Amphibia) as inferred from nuclear and mitochondrial DNA

- variation, with a description of a new species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55(2010): 1146-1166.
- Harrison, R.** 1989 Animal DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 4:6-11.
- Hedrick, P. W.** 2000. *Genetics of Populations*. Jones and Barlett Publishers, Boston.
- Hedrick, P. W.** 2011. *Genetics of populations*. Jones and Barlett Publishers. Cuarta edición. Sudbury, Massachusetts, pp 553.
- Hillis, D. M. y Dixon, M.T.** 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology*, 66(4): 411-453.
- Hillis, D. M. y Bull, J. J.** 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, 42: 182-192.
- Hillis, D. M. y Wiens, J. J.** 2000. Molecules versus morphology in systematics. Págs. 1-19 en (Wiens, J. J. ed.). *Phylogenetic analysis of morphological data*. Smithsonian Institution Press. Washington.
- Hua, X., Fu, C., Li, J., Nieto, A. y Wiens, J.** 2009. A revised phylogeny of Holarctic treefrogs (genus *Hyla*) based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Herpetologica*, 65(3): 246–259.
- Huelsenbeck, J. P. y Ronquist, F.** 2001. MrBayes: bayesian inference of phylogenetic trees. *Bionformatics*, 17(8): 754-755.
- Huson, D.H. y Bryant, D.** 2006. Application of phylogenetic networks n evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23(2): 254-267.
- Johns, G. C. y Avise, J. C.** 1998. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates form the mitochondrial cytochrome b gene. *Molecular Biology And Evolution*, 15: 1481-1490.
- Li, W. H.** 2000. *Fundamentals of molecular evolution*. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts, E. U. A. 478 pp.
- Librado, P. y Rozas, J.** 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451–145.
- Littlejohnh, M.** 1977. Long range acoustic communication in anurans: An integrated and evolutionary approach, en (Taylor, D. H. y Guttman, S. I. eds.) *The reproductive biology of the amphibians*. NY, Plenum Press.

- Luna, V. I. y Llorente, J.** 1993. Biogeografía y biodiversidad. Págs. 553-557, en, (Luna, V. I. y Llorente, J. eds.) Historia Natural del Parque Ecológico Estatal Omiltemi, Chilpancingo, Guerrero, México. UNAM- CONABIO.
- Long, E. O. y Dawid, I. B.** 1980. Repeated genes in eucaryotes. Annual Review of Biochemistry, 49: 727-764.
- Mayr, E.** 1942. Systematics and the origin of species. Columbia University Press, Nueva York.
- Mindell, D. P., Honeycutt, R. L.** 1990. Ribosomal RNA in vertebrates: evolution and phylogenetic applications. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics, 21: 541-566.
- Mullis, K. B., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. y Erlich, H.** 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 51: 263-273.
- Nei, M.** 1972. Genetic distance between populations. The American Naturalist, 106: 283- 292.
- Nei, M.** 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, Nueva York.
- Neigel, J. E. y Avise, C. J.** 1986. Phylogenetic relationships of mitochondrial DNA under various demographic models of speciation. Págs. 515-534 en (E. Nevo y S. Karlin eds.) Evolutionary Processes and Theory. Academic Press, Nueva York.
- Ochoa-Ochoa, L., Flores-Villela, O., García-Vázquez, U., Correa-Cano, M. y Canseco-Márquez, L.** 2006. “*Hyla arboricola* (rana de arborícola). Área de distribución potencial”, escala: 1:1000000. Museo de Zoología Alfonso L. Herrera, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ochoa-Ochoa, L., Flores-Villela, O., García-Vázquez, U., Correa-Cano, M. y Canseco-Márquez, L.** 2006. “*Hyla eximia* (rana de árbol de montaña). Área de distribución potencial”, escala: 1:1000000. Museo de Zoología Alfonso L. Herrera, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Palo, J. U., Schmeller, D. S., Laurila, A., Primmer, C. R., Kuzmins, S. L. y Merila, J.** 2004. High degree of population subdivision in a widespread amphibian. Molecular Ecology, 13: 2631-2644.
- Patterson, J., Chamberlain, B. y Thayer, D.** 2004. Finch TV version 1.4.0. Publicado por los autores, Seattle.

- Peakall**, R. y **Smouse**, P. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Bioinformatics*, 28: 2537-2539.
- Posada**, D. y **Crandall**, K.A. 1998. JModeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.
- Posada**, D. y **Crandall**, K.A. 2001. Intraespecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution*, 16(1): 37-45.
- Pritchard**, J. K., **Stephens**, M. y **Donnelly**, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945–959.
- Ramos-Onsins**, S. E. y **Rozas**, J. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, 19(12): 2092-2100.
- Rivera**, A. C. R. 2016. Filogeografía de la tortuga chipontil (*Claudius angustatus*) a partir de genes mitocondriales y nucleares. Tesis de maestría, Instituto de Biología, UNAM. México D. F. 95 p.p.
- Rodríguez-Tejeda**, R. E., **Méndez-Cárdenas**, M. G., **Islas-Villanueva**, V. y **Macías**, C. 2014. Geographic variation in the advertisement calls of *Hyla eximia* and its possible explanations. *PeerJ*, 2:e420.
- Schaal**, B. A., **D. A. Hayworth.**, **K. M. Olsen.**, **J. T. Rauscher** y **W. A. Smith**. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology*, 7: 465-474.
- Schwartz** , J. J. y **Wells**, K. D. 1983. An experimental study of acoustic interference between two species of neotropical treefrogs. *Animal Behavior*, 31: 181-190.
- Silvestro**, D. F. y **Michalak**, I. 2012. RAxML GUI: a graphical front- end for RAxML. *Organisms Diversity and Evolution*, 12: 335- 337.
- Soltis**, S. P. y **Soltis**, E. D. 2003. Applying the bootstrap in phylogeny reconstruction. *Statistical Science*, 18(2):256-267.
- Stebbins**, R. C. 2003. A field guide to Western reptiles and amphibians. Third Edition. Peterson Field Guide Series. Houghton Mifflin Company, Boston.
- Stucky**, B. J. 2012. SeqTrace: a graphical tool for rapidly processing DNA sequencing chromatograms. *Journal of Biomolecular Techniques*, 23: 90-93.
- Tajima**, F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105(2), 437-460.

- Tajima, F.** 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. y Kumar, S.** 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725–2729.
- Taylor, E. H.** 1941. Herpetological miscellany N°II. *Kansas University Science Bulletin* 27(7): 105-139.
- Templeton, A. R.** 1989. The meaning of species and speciation: a genetics perspective. En: *Progress in population genetics and human evolution*. Springer, Nueva York.
- Vaidya, G., Lohman, D. J. y Meier, R.** 2011. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics*, 27(2):171-180.
- Vázquez-Dominguez, E.** 2007. Capítulo 14: Filogeografía y vertebrados. Págs 441-466 en (Eguiarte, L., Souza, V.y Aguirre X., eds.) *Ecología molecular*. 2007. Instituto Nacional de Ecología. México, D. F.
- Vences, M., Thomas, M., Van der Meijden, A., Chiari, Y. y Vieites, D. R.** 2005. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology*, 2(1): 5.
- Ward, D. M.** 1998. A natural species concept for prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology*, 1: 271- 277.
- Wells, K. D.** 1988. The effect of social interactions on anuran vocal behavior. En (Fritzsche, .B., Ryan, M. J., Wilczynski, W.,Hetherington, T. E. y Walkowiak, W.) *The evolution of amphibian auditory system*. NY, John Wiley and Sons.
- Wiens, J. J.** 2004. What is speciation and how should we study it? *The American Naturalist*, Vol. 163, No. 6.
- Wilson, A. C., Maxson, L. R., Sarich, V. M.** 1974. Two types of molecular evolution. Evidence from studies of interspecific hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71: 2843-2847.
- Wilson, A. C., Cann, R. L., Carr, S. M., George, M., Gyllensten, U. B., Helm-Bychowski, K. M., Higuchi, R. G., Palumbi, S. R., Prager, E. M., Sage, R. D. y Stoneking M.** 1985.



Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society*, 26: 375-400.

**Zeisset**, I. y Beebee, T. J. C. 2008. Amphibian phylgeography: a model for understanding historical aspects of species distribution. *Heredity*, 101: 109-119.

## XII. ANEXOS

### ANEXO I

El Citocromo b (*Cyt b*) es considerado uno de los genes más útiles para los análisis filogenéticos y probablemente es el gen mitocondrial mayor conocido por su estructura y función como producto proteico (Farias *et al.*, 2001; Castresana, 2001). Este gen parece evolucionar a una velocidad similar en una amplia variedad de organismos vertebrados cerca del 2% en un millón de años (Johns y Avise, 1998). El gen mitocondrial *Cyt b* codifica para una proteína transmembranal que se localiza en la membrana interna de la mitocondria. Es una de las proteínas que forman el complejo III del sistema de fosforilación oxidativa I (Rivera, 2016) y está involucrado en el transporte de electrones en la cadena respiratoria (Esposti *et al.*, 1993; Giraldo *et al.*, 2011). El gen *Cyt b* tiene una evolución tanto lenta como rápida en las posiciones de los codones, así como regiones o dominios más conservados y otros más variables, sin embargo, algunos problemas han sido detectados al usar *Cyt b* incluyendo sesgos de composición de bases, variación de velocidad entre linajes, saturación en la tercera posición del codón y variación limitada en la primera y segunda posición del codón; lo que resulta en poca información filogenética para preguntas evolutivas profundas o en pocos sitios informativos para la tercera posición del codón en los niveles de población (Farias *et al.*, 2001).

En el caso del ADN ribosomal, las secuencias son no codificantes por lo que no contienen información para sintetizar proteínas, esto significa que la información que tienen se transcribe a ARN pero no se traduce a proteínas (Carranza, 2002). El ADN ribosomal se presenta en repeticiones tándem formado por tres subunidades altamente conservadas, estas repeticiones se encuentran a lo largo de todo el genoma y evolucionan concertadamente (Long y Dawid, 1980; Arnheim *et al.*, 1980; Hillis y Dixon, 1991). Debido a la baja tasa de sustitución que presentan estas secuencias resultan ser útiles en el planteamiento de hipótesis de relaciones filogenéticas en taxones con tiempos de divergencia muy antiguos. El ARNr más estudiado es la pequeña subunidad del gen nuclear 16-18 ARNr, esto se debe a que la tasa de evolución se encuentra entre las secuencias más bajas en los organismos actuales y es por eso que ha sido muy útil para examinar eventos de evolución antigua (Hillis y Dixon, 1991). El gen 16S es un marcador mitocondrial ribosomal altamente conservado aunque las mutaciones son comunes en algunas regiones variables que corresponden a loops en la estructura ribosomal del ARN (Vences *et al.*, 2005). En secuencias alineadas del gen 16S se han observado relativamente pocos sitios variables incluso desde la divergencia de mamíferos y anfibios, entre los 300 y 400 millones de años

(Hillis y Dixon, 1991); es por esto que este gen es potencialmente informativo para dilucidar genealogías entre taxones que divergieron hace 300 millones de años (Mindell y Honeycutt, 1990). En anfibios esto asegura una cantidad suficiente de mutaciones entre especies ya que muchas especies son entidades relativamente viejas (Wilson *et al.*, 1974), debido a esto el gen 16S es suficientemente variable para identificar de manera confiable a la mayoría de las especies y asignar a nivel de clase y orden, incluso con un mayor potencial que el gen COI (Vences *et al.*, 2005).

## ANEXO II

### Extracción de ADN.

El protocolo de extracción de ADN se realizó con el kit de DNEASY BLOOD & TISSUE de QIAGEN de la siguiente manera:

1. En un tubo de 1.5 ml se colocaron 20  $\mu$ l de proteínasa K, se agregó un pedazo pequeño de tejido (Aproximadamente 5 mm) y 200  $\mu$ l de PBS.
2. Se agregó 200  $\mu$ l de buffer AL, se mezcló en el vórtex y se dejó incubando a 56°C de 3 a 4 horas.
3. Se agregó 200  $\mu$ l de etanol al 96% y se mezcló en el vórtex. Se centrifugó por 1 minuto 30 segundos a 8000 rpm (este paso no está en el protocolo original).
4. Se pasó el contenido a un tubo con columna (teniendo cuidado de no tocar el precipitado). Se centrifugó 1 minuto a 8000 rpm y se descartó el tubo sin columna.
5. Se pasó la columna a un tubo de 2 ml y se agregó 500  $\mu$ l de buffer AW1. Se centrifugó a la misma velocidad y mismo tiempo.
6. Se descartó el tubo sin columna, se pasó a un nuevo tubo de 2 ml y se agregó 500  $\mu$ l de buffer AW2. Se centrifugó por 3 minutos a 14000 rpm y se descartó el tubo sin columna.
7. La columna se transfirió a un tubo de 1.5 ml. y se agregó 80  $\mu$ l de buffer AE (en el protocolo original se deja en 150  $\mu$ l).
8. Se dejó incubando a temperatura ambiente por 20 minutos y finalmente se centrifugó 1 min a 8000 rpm. La muestra se guardó a -20 °C.

### ANEXO III

#### Purificación de las muestras para *Cyt b*

El protocolo para la precipitación con alcohol fue el siguiente:

1. Se colocó 11.5 µl de agua, 8 µl de NaAc 3M y 8.5 µl de la muestra de PCR en un tubo de 0.5 ml. Se mezcló bien por pipeteo. Se agregaron 80 µl de alcohol al 96% (-20°C) y se vortexeo.
2. La muestra se incubó a -20°C por 30 minutos y se centrifugó por 15 minutos a 10000rpm. Se retiró el sobrenadante por medio de pipeteo y se agregaron 200 µl de alcohol al 70% (a temperatura ambiente).
3. Se centrifugó por 10 minutos a 10000 rpm y se retiró el sobrenadante por pipeteo.
4. La muestra se dejó secar en la vacuófaga de 10 a 15 minutos y se resuspendió en 6 µl de buffer AE. Se vortexeo por 20 segundos y se guardó a -20 °C.

### ANEXO IV

#### Purificación de las muestras para 16S

El protocolo para la purificación de PCR con kit de Invitrogen fue el siguiente:

1. Se agregaron cuatro volúmenes del Buffer HC (utilizado para eliminar dímeros de primers) con isopropanol a un volumen de producto de PCR (Aproximadamente 10.5 µl del producto de PCR y 42 µl de B2) y se mezcló bien.
2. Se pasó el contenido a una columna con tubo incluida en el kit, se centrifugó por 1 minuto a 10000 rpm y se desechó el líquido del tubo.
3. Se agregó 650 µl del buffer de lavado con alcohol a la columna y se centrifugó al mismo tiempo y misma velocidad desechando el líquido del tubo.
4. Se volvió a centrifugar la columna a 14000 rpm por 3 minutos para remover cualquier residuo del buffer de lavado. Se colocó la columna en un tubo nuevo de 1.5 ml y se colocó 20 µl de buffer de elución en el centro de la columna.
5. La columna se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó por 2 minutos a 14000 rpm.
6. Se desechó la columna, el tubo contiene la muestra de PCR purificada. Se guardó a -20 °C.

**ANEXO V**  
**Conformación de los haplotipos del gen ND4**

<b>Haplotipo</b>	<b>No. de individuos</b>	<b>Individuos</b>
<b>H_1</b>	13	AL01, AL02, AL03, AL10, AL11, AL13, AL16, AL18, PA04, PA06, PA08, PA09, PA13
<b>H_2</b>	1	AL04
<b>H_3</b>	1	AL09
<b>H_4</b>	10	AL12, AL17, PA01, PA03, PA05, PA07, PA10, PA11, PA12, PA14
<b>H_5</b>	1	AL14
<b>H_6</b>	1	AL15
<b>H_7</b>	1	AL19
<b>H_8</b>	12	OM01, OM02, OM03, OM04, OM05, OM06, OM07, OM09, OM10, OM11, OM13, OM14
<b>H_9</b>	2	OM08, OM12
<b>H_10</b>	1	OM15
<b>H_11</b>	1	PA02
<b>H_12</b>	1	PA15
<b>H_13</b>	11	TE01, TE02, TE05, TE06, TE07, TE09, TE10, TE11, TE13, TE14, TE15
<b>H_14</b>	1	TE03
<b>H_15</b>	1	TE04
<b>H_16</b>	1	TE08
<b>H_17</b>	1	TE12

**Conformación de los haplotipos del gen *Cyt b***

<b>Haplotipo</b>	<b>No. de individuos</b>	<b>Individuos</b>
<b>H_1</b>	23	AL01, AL03, AL09, AL10, AL11, AL12, AL13, AL14, AL15, AL18, AL19, PA01, PA03, PA04, PA05, PA06, PA08, PA09, PA10, PA12, PA13, PA14, TE03
<b>H_2</b>	1	AL02
<b>H_3</b>	1	AL04
<b>H_4</b>	1	AL16
<b>H_5</b>	1	AL17
<b>H_6</b>	15	OM01-OM15
<b>H_7</b>	1	PA02
<b>H_8</b>	2	PA07, PA11
<b>H_9</b>	1	PA15
<b>H_10</b>	1	TE01
<b>H_11</b>	1	TE02
<b>H_12</b>	6	TE04, TE05, TE08, TE10, TE12, TE13
<b>H_13</b>	1	TE06
<b>H_14</b>	1	TE07
<b>H_15</b>	1	TE09
<b>H_16</b>	3	TE11, TE14, TE15

**Conformación de los haplotipos del gen 16S**

<b>Haplotipo</b>	<b>No. de individuos</b>	<b>Individuos</b>
<b>H_1</b>	1	AL01
<b>H_2</b>	18	AL02, AL03, AL04, AL09, AL11, AL13, AL14, AL15, AL16, AL18, PA01, PA06, PA07, PA08, PA09, PA10,

		PA11, PA15
H_3	1	AL10
H_4	3	AL12, AL17, AL19
H_5	7	TE01, TE02, TE05, TE07, TE10, TE12, TE13
H_6	1	TE03
H_7	1	TE04
H_8	1	TE06
H_9	2	TE08, TE15
H_10	1	TE09
H_11	2	TE11, TE14
H_12	4	OM01, OM02, OM04, OM15
H_13	8	OM03, OM05, OM06, OM07, OM10, OM11, OM13, OM14
H_14	2	OM08, OM12
H_15	1	OM09
H_16	1	PA03
H_17	1	PA04
H_18	1	PA05
H_19	1	PA12
H_20	1	PA13
H_21	1	PA14

#### Conformación de los haplotipos del análisis concatenado

Haplotipo	No. de individuos	Individuos
H_1	11	AL01, AL03, AL10, AL11, AL13, AL18, PA04, PA06, PA08, PA09, PA13
H_2	1	AL02
H_3	1	AL04

H_4	1	AL09
H_5	7	AL12, PA01, PA03, PA05, PA10, PA12, PA14
H_6	1	AL14
H_7	1	AL15
H_8	1	AL16
H_9	1	AL17
H_10	1	AL19
H_11	12	OM01, OM02, OM03, OM04, OM05, OM06, OM07, OM09, OM10, OM11, OM13, OM14
H_12	2	OM08, OM12
H_13	1	OM15
H_14	1	PA02
H_15	2	PA07, PA11
H_16	1	PA15
H_17	1	TE01
H_18	1	TE02
H_19	1	TE03
H_20	1	TE04
H_21	3	TE05, TE10, TE13
H_22	1	TE06
H_23	1	TE07
H_24	1	TE08
H_25	1	TE09
H_26	3	TE11, TE14, TE15
H_27	1	TE12