



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**DIVERSIDAD GENÉTICA DEL AJOLOTE
MEXICANO (*Ambystoma mexicanum*) DE LA
UMA DEL VIVARIO DE LA FES IZTACALA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGA

P R E S E N T A

ERÉNDIRA ALEJANDRA ARANA ÁLVAREZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. FRANCISCO ALBERTO RIVERA ORTIZ

2023

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA DE BAZ,
ESTADO DE MÉXICO, 2023





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICATORIA

A mi mamá Claudia Alejandra Álvarez Vázquez, a mi papá Jorge Luis Álvarez Vázquez y a mi abuelita Aurora Vázquez López por inspirarme a seguir adelante con todo el amor, el tiempo y las enseñanzas que me han brindado a lo largo de mi vida.

A mi hermano Edson y mi cuñada Liz por estar siempre dispuestos a esforzarse y por formar una familia de la que agradezco ser parte.

A mi querido Dante por iluminar mis días y darme su amistad y compañía.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó gracias al proyecto PAPIIT de la DGAPA con la clave IA207821.

Agradezco al Dr. Francisco Alberto Rivera Ortiz por darme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto, por guiarme y enseñarme con paciencia y por motivarme y aconsejarme a lo largo de este tiempo.

Le doy las gracias mi comité tutorial: Dr. Oscar Salomón Sanabria Urbán, Víctor Hugo Jiménez Arcos, Dra. Fabiola Soto Trejo y Dra. Ana María Contreras González por las correcciones y comentarios que hicieron para mejorar este trabajo.

Gracias al profesor Felipe Correa Sánchez por contestar mis preguntas y dudas sobre los ajolotes con tanta amabilidad y disposición.

Les agradezco a mis compañeras Itzel Salazar y Cynthia Vilchis por ayudarme en la toma de las muestras de los ajolotes y la extracción de ADN, así como por acompañarme y platicar conmigo en los días de laboratorio.

También agradezco a mis amigas Mitzi y Jos por darle sentido a estos años en la facultad, por escucharme y ayudarme, por las risas compartidas y los momentos juntas.

Doy gracias a mi familia por apoyarme, consentirme y darme las herramientas que me han permitido culminar esta etapa de mi vida.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	V
RESUMEN.....	VI
INTRODUCCIÓN.....	1
<i>Importancia de los anfibios</i>	1
<i>Declive de las poblaciones de anfibios</i>	2
<i>Situación del género Ambystoma</i>	3
<i>Ambystoma mexicanum</i>	6
<i>Genética de poblaciones</i>	8
<i>Evaluación de la variación genética</i>	10
<i>Genética de la conservación</i>	11
ANTECEDENTES	15
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS PARTICULARES.....	20
MATERIAL Y MÉTODOS	21
<i>Colecta de muestras y extracción de DNA</i>	21
<i>Amplificación ADN</i>	22
RESULTADOS	24
DISCUSIÓN.....	26
<i>Número de alelos</i>	26
<i>Heterocigosis y endogamia</i>	28
<i>Implicaciones para la conservación</i>	30
CONCLUSIONES.....	31
REFERENCIAS	32

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Distribución del género <i>Ambystoma</i> (tomado de Vitt y Caldwell, 2014)	4
Figura 2. Ocurrencia de <i>Ambystoma mexicanum</i> desde 1995 hasta 2013 (tomado de Levy-Gálvez, 2017)	7
Figura 3. Implicaciones y objetivos de la genética de la conservación (tomado de Souty-Grosset, 2003).	14
Figura 4. Número de ajolotes de la UMA de la FES Iztacala desde su fundación hasta la actualidad (1996-2023).	17
Figura 5. Ejemplar de <i>A. mexicanum</i> de la UMA de la FES Iztacala.	21
Tabla 1. Estado de conservación de las especies del género <i>Ambystoma</i> según la NOM-059: (Pr) sujeta a protección especial, (A) amenazada, (P) en peligro de extinción; según la IUCN: (LC) preocupación menor, (EN) en peligro, (CR) en peligro crítico, (DD) datos deficientes, (NE) no evaluado (tomado de Ávila-Akerberg, 2021; Frías-Álvarez, 2010).	5
Tabla 2. Fuerzas que generan cambios en las frecuencias alélicas (basado en Pierce, 2009).	9
Tabla 3. Secuencia, tamaño y temperatura estandarizada para la amplificación de cada primer.	20
Tabla 4. Frecuencias alélicas.	22
Tabla 5. Número de individuos (N), número de alelos (Na), número efectivo de alelos (Ne), heterocigotos observados (Ho), heterocigotos esperados (He), coeficiente de endogamia (F_{IS}), desviación del equilibrio Hardy-Weinberg (HW).	23

RESUMEN

El ajolote mexicano (*Ambystoma mexicanum*) es una especie endémica de México que se encuentra en peligro de extinción debido a la reducción y contaminación de su hábitat, la introducción de especies exóticas y la sustracción de ejemplares. Las poblaciones actuales cuentan con pocos individuos y se estima que la extinción de la especie en vida silvestre tendrá lugar en esta década. Por ello, el mantenimiento de ajolotes en cautiverio es importante para su protección y conservación; sin embargo, la cautividad puede acarrear consecuencias desfavorables como la reducción de la variación genética y el aumento de la endogamia, por lo que es indispensable realizar estudios de genética poblacional en las colonias en cautiverio. El objetivo de este proyecto fue evaluar la diversidad genética de la colonia de *Ambystoma mexicanum* de la UMA del vivario de la FES Iztacala con el fin de ayudar a los programas de conservación de la especie. Se utilizaron cinco microsatélites, de los cuales dos (At52.10 y Atig52.41) presentaron alelos nulos y deficiencia de heterocigotos, por lo que no fueron contemplados en el presente estudio; los microsatélites Atig52.118, Atig52.86 y Atig60.156, que no han sido publicados, mostraron ser aptos para estudios de diversidad genética de *Ambystoma mexicanum*. Se encontró que hay un alto número de heterocigotos ($H_e=0.537$, $H_o=0.763$), pero una cantidad baja de alelos por locus ($N_a=3.667$). Estos valores podrían ser consecuencia de un tamaño poblacional grande en el pasado y la presencia de polimorfismos ancestrales, así como de la pérdida histórica de alelos en el género *Ambystoma* y de las muertes masivas de la colonia entre 2003 y 2006. El nivel de endogamia es bajo ($F_{IS}=-0.396$), por lo que el manejo de los ajolotes en cuanto a su reproducción ha resultado favorable. El estudio de la diversidad genética de *Ambystoma mexicanum* en cautiverio es importante para ayudar a los programas de conservación de la especie y protegerlos de la extinción.

INTRODUCCIÓN

Importancia de los anfibios

La Clase Amphibia es un grupo monofilético compuesto por tres órdenes: Anura (ranas y sapos), Caudata (salamandras y tritones) y Gymnophiona (cecilias). Las características de los anfibios incluyen una piel desnuda, vascularizada y permeable con una gran cantidad de glándulas que la humectan, producen feromonas y secretan sustancias irritantes o tóxicas (Parra-Olea et al., 2014). Además, son ectotermos (no pueden generar su propio calor corporal por lo que éste es regulado por el ambiente), los huevos no poseen membranas extraembrionarias, la fecundación puede ser externa o interna y pueden tener desarrollo indirecto o directo (Canseco-Márquez y Gutiérrez-Mayén, 2010; Ramírez-Bautista et al., 2009).

Debido a las adaptaciones evolutivas de los anfibios y al ciclo de vida bifásico que la mayoría posee, existe una diferenciación de nicho ecológico que contribuye al flujo de materia, nutrientes y energía entre ambientes acuáticos y terrestres. Además, favorece la reducción de la competencia intraespecífica y la obtención de energía de distintas fuentes, lo que ayuda a reducir el agotamiento de un recurso en particular y a mantener la estabilidad del ecosistema (West, 2018; Hocking & Babbitt, 2014). Otro aspecto elemental de los anfibios es que controlan las poblaciones de muchos invertebrados y, a su vez, son el alimento de otros depredadores (Koo y Wake, 2018). Además de su importancia ecológica y evolutiva, los anfibios poseen un papel en la cultura de diversas sociedades, pues a lo largo de la historia han tenido usos medicinales, alimenticios, religiosos y comerciales (Ávila-Nájera et al, 2018).

En el mundo se han descrito alrededor de 7900 especies de anfibios; sin embargo, el 41% de ellas se encuentra amenazada o en peligro de extinción, porcentaje que podría ser mayor debido a que se desconoce el estado de conservación de 1184 especies (Koo y Wake, 2018; IUCN, 2022). La aceleración en el declive de las poblaciones de anfibios a nivel mundial ha sido registrada desde la década de 1980; sin embargo, las

causas eran inciertas. En la actualidad se han elaborado estudios e hipótesis que buscan explicar los motivos y el impacto de la pérdida de anfibios (Crump, 2019).

Declive de las poblaciones de anfibios

Las causas del declive de las poblaciones de anfibios incluyen la pérdida y transformación del hábitat como consecuencia de actividades humanas vinculadas a la expansión urbano-rural. La expansión de poblaciones humanas, a su vez, demanda el cambio de uso de suelo para la generación de tierras de cultivo (agricultura), deforestación y explotación maderable (Cordier et al., 2021). Estos factores, así como la introducción de especies exóticas son una amenaza importante, especialmente para especies acuáticas o con parte de su ciclo de vida realizado en cuerpos de agua (Lips et al., 2005). Las especies exótico-invasoras generan un incremento de la competencia, la depredación y la posible introducción de patógenos (Nunes et al. 2019). Sin embargo, la segunda mayor amenaza asociada a la crisis de extinción de poblaciones y especies de anfibios es la quitridiomycosis. Esta enfermedad es causada por *Batrachochytrium dendrobatidis*, un hongo patógeno que afecta a las poblaciones de anfibios a nivel mundial. La quitridiomycosis está vinculada al declive poblacional y posible extinción de especies de anfibios en diferentes regiones del mundo, siendo la región de Mesoamérica una de las más afectadas (Scheele et al. 2019).

Adicionalmente, otras actividades humanas pueden generar amenazas o factores de presión que incrementan la susceptibilidad de las poblaciones de anfibios. La reducción de la capa ozono y por ende el incremento de la radiación UV-B pueden generar malformaciones o reducir el éxito de eclosión de las larvas de anfibios (Collins y Storfer, 2003). La contaminación de suelo y agua debido a malas prácticas de manejo de fertilizantes y pesticidas también está vinculada a la reducción poblacional de anfibios (Pessier, 2018). El cambio climático también se espera que tenga un efecto nocivo en el mediano plazo, dado que los anfibios poseen las temperaturas de actividad en campo más bajas dentro de los vertebrados terrestres (Corn, 2005). Estas amenazas pueden actuar en sinergia incrementando su efecto negativo sobre las

poblaciones de anfibios, por lo que el escenario para lograr su conservación es complejo. A pesar de que a lo largo de su historia evolutiva los anfibios han experimentado fluctuaciones de temperaturas y humedad en el ambiente, se pronostica que los cambios en los patrones climáticos aumentarán a una velocidad sin precedentes, teniendo como consecuencia que los anfibios pudieran extinguirse completamente y que actualmente se encuentren dentro de los grupos animales más vulnerables al cambio global (Nowakowski et al. 2018; Pyron 2018).

En México la situación no es distinta, ya que también enfrenta una disminución en la diversidad de anfibios: de las 376 especies que habitan en el país, 195 están catalogadas en algún grado de riesgo de acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010). Las causas principales que contribuyen a la disminución de las poblaciones de anfibios en México son de origen antropogénico como la deforestación y el cambio de uso de suelo, lo que compromete aún más a estos organismos, pues el 67% de las especies son endémicas del territorio mexicano, por lo que su distribución es limitada (SEMARNAT, 2010; Parra-Olea *et al*, 2014); de las 15 especies de anfibios que se encuentran en la categoría de Peligro de Extinción (P), 13 son endémicas (SEMARNAT, 2018).

Situación del género *Ambystoma*

Las poblaciones pequeñas de anfibios son más sensibles a los factores mencionados en el apartado anterior; además, los anfibios que presentan pocas poblaciones tienen más riesgo de extinguirse debido a que son vulnerables ante eventos estocásticos y a la reducción de flujo genético y recolonización (Wake y Vredenburg, 2008; Chanson et al.). Esto es especialmente peligroso en México debido a que es un país con una gran diversidad de especies de anfibios con un alto grado de endemismo (Parra-Olea et al., 2014).

Dentro de los anfibios con alto grado de endemismo se encuentran las especies del género *Ambystoma*. Para algunas especies se conoce una población (e.g. *A. andersoni*, *A. taylori*) y en varios casos, se conocen pocas poblaciones (e.g. *A. leorae*,

A. lermaense). Además, se registran 33 especies de este género con distribución exclusiva en Norteamérica (Figura 1). De las 18 especies que habitan en México 16 son endémicas, y, consecuentemente, tienen una distribución restringida, lo que representa un mayor riesgo de extinción para una gran cantidad de especies de este género en nuestro país (Frías-Álvarez y Flores-Villela, 2010). Todas las especies de *Ambystoma* en México pertenecen al complejo de *Ambystoma tigrinum* que, aunque no es una categoría taxonómica tradicional, hace referencia a que sus linajes están relacionados ya que pudieron haber diversificado a partir de una radiación rápida y reciente (Cole, 2007; Everson et al, 2021).

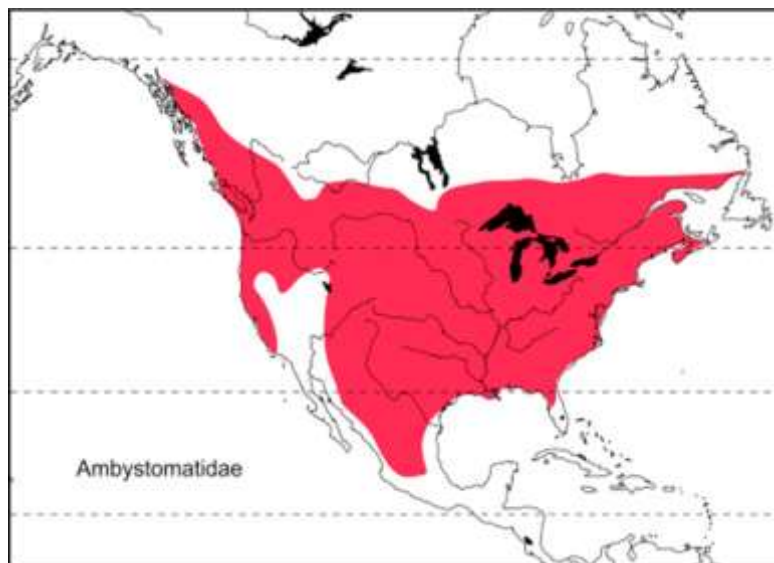


Figura 1. Distribución del género *Ambystoma* (tomado de Vitt y Caldwell, 2014)

Los ajolotes o achoques, como son llamados los organismos del género *Ambystoma*, son salamandras de cuerpo alargado y robusto; tienen una cabeza ancha, pulmones y branquias. Habitan en lagos y arroyos, donde las características propias de estos cuerpos de agua han favorecido la adaptación y diferenciación fenotípica a las condiciones particulares de cuerpos de agua lénticos y lóticos (SEMARNAT, 2018). Al igual que los demás anfibios, algunas especies de ajolotes pueden transformarse en adultos por medio de la metamorfosis. Sin embargo, algunas especies no son capaces de realizar la metamorfosis, por lo que alcanzan la madurez reproductiva mientras conservan características larvales como las branquias, la aleta de la cola y ausencia

de párpados (Villegas-Palma, 2015). Este fenómeno es conocido como pedomorfosis y es un tipo de neotenia donde se alcanza la madurez sexual pero no la madurez somática completa. Por consiguiente, las especies paedomorficas obligadas (como *A. mexicanum*) no abandonan el medio acuático, siendo potencialmente más sensibles a la extinción de poblaciones (Estrada-Romero, 2015).

Las principales amenazas a las que se enfrentan los ajolotes son la pérdida de hábitat; el entubamiento de arroyos; los peces exóticos como las carpas, las tilapias y las truchas; la contaminación y eutrofización de los cuerpos de agua; la extracción y venta de estos organismos, así como la urbanización acelerada en el territorio mexicano (SEMARNAT, 2010). Esto ha conllevado a que de las 18 especies de *Ambystoma* que habitan el país, 15 están en alguna categoría de riesgo dentro de la NOM-059-SEMARNAT-2010; 11 están sujetas a Protección Especial (Pr); tres, como Amenazadas (A) y una, en Peligro de Extinción (P) (Tabla 1) (NOM-059-SEMARNAT-2010, 2010; Ávila-Akerberg et al., 2018).

Tabla 1. Estado de conservación de las especies del género *Ambystoma* según la NOM-059: (Pr) sujeta a protección especial, (A) amenazada, (P) en peligro de extinción; según la IUCN: (LC) preocupación menor, (EN) en peligro, (CR) en peligro crítico, (DD) datos deficientes, (NE) no evaluado (tomado de Ávila-Akerberg, 2021; Frías-Álvarez, 2010).

Especie	Estado de conservación		Endémica de México
	NOM-59	IUCN	
<i>Ambystoma altamirani</i>	A	EN	x
<i>Ambystoma amblycephalum</i>	Pr	CR	x
<i>Ambystoma andersoni</i>	Pr	CR	x
<i>Ambystoma bombypellum</i>	Pr	CR	x
<i>Ambystoma dumerilli</i>	Pr	CR	x
<i>Ambystoma flavipiperatum</i>	Pr	DD	x
<i>Ambystoma granulorum</i>	Pr	CR	x
<i>Ambystoma leorae</i>	A	CR	x
<i>Ambystoma lermaense</i>	Pr	CR	x

<i>Ambystoma mavortium</i>	-	CR	
<i>Ambystoma mexicanum</i>	P	CR	x
<i>Ambystoma ordinarium</i>	Pr	EN	x
<i>Ambystoma rivulare</i>	A	DD	x
<i>Ambystoma rosaceum</i>	Pr	LC	x
<i>Ambystoma silvense</i>	-	DD	x
<i>Ambystoma subsalum</i>	-	NE	x
<i>Ambystoma taylori</i>	Pr	CR	x
<i>Ambystoma velasci</i>	Pr	LC	x

Ambystoma mexicanum

Dentro del género *Ambystoma*, el ajolote mexicano (*A. mexicanum*) es la única especie catalogada como en peligro de extinción (SEMARNAT, 2010). Estos ajolotes miden aproximadamente 42.13 cm de longitud desde el hocico hasta la cola, la cual está aplanada dorso-lateralmente. El color de su piel puede variar entre el café, verde, negro y, en algunas ocasiones, rosado o albino en individuos manejados en cautiverio. Los adultos son pedomórficos, ya que alcanzan la madurez sexual al mismo tiempo que siguen poseyendo características larvales. Se alimentan de insectos, crustáceos y peces pequeños peces o alevines (Vargas-Gómez, 2021). En cautiverio y con las condiciones adecuadas (aguas con pocas corrientes, pH de 6.5 a 8, temperaturas entre 10°C y 18°C y una dieta variada) los ajolotes viven en promedio entre 8 y 10 años (Mena-González y Servín-Zamora, 2014).

En el año 2004 persistían tres poblaciones silvestres de *A. mexicanum*, una de ellas en un pequeño sitio en el lago de Chalco. La segunda en el lago viejo de Chapultepec, población de 26 adultos que fue descubierta cuando se drenó este cuerpo de agua en 2004, y la tercera en los canales de Xochimilco (Recuero et al. 2010). En la actualidad, los canales de Xochimilco son el último remanente del sistema de humedales sobre el que se sitúa la actual Ciudad de México (Griffiths et al, 2004). El sistema lacustre de Xochimilco cuenta con alrededor de 42 km² de canales de agua, mismos que

presentan ambientes en diferentes estados de conservación a causa de actividades como la agricultura y el turismo, así como consecuencia de la urbanización y la contaminación del agua (Contreras et al, 2019).

Los factores antropogénicos ya mencionados, aunado a los factores de riesgo en Xochimilco, la introducción de especies exóticas de peces (e.g. carpas), han llevado a la disminución de las poblaciones del ajolote mexicano. Se calculaba que en el año 2013 quedaban 99.1 individuos por cada kilómetro cuadrado (Figura 2), aunque es probable que actualmente la ocurrencia sea menor (Lavy-Galvéz, 2017).

Levy-Galvéz (2017) menciona que solo algunos sitios en Xochimilco cuentan con las condiciones abióticas adecuadas para la supervivencia y reproducción de estos organismos. Asimismo, esta autora estima que *A. mexicanum* podría extinguirse en estado silvestre en esta década.

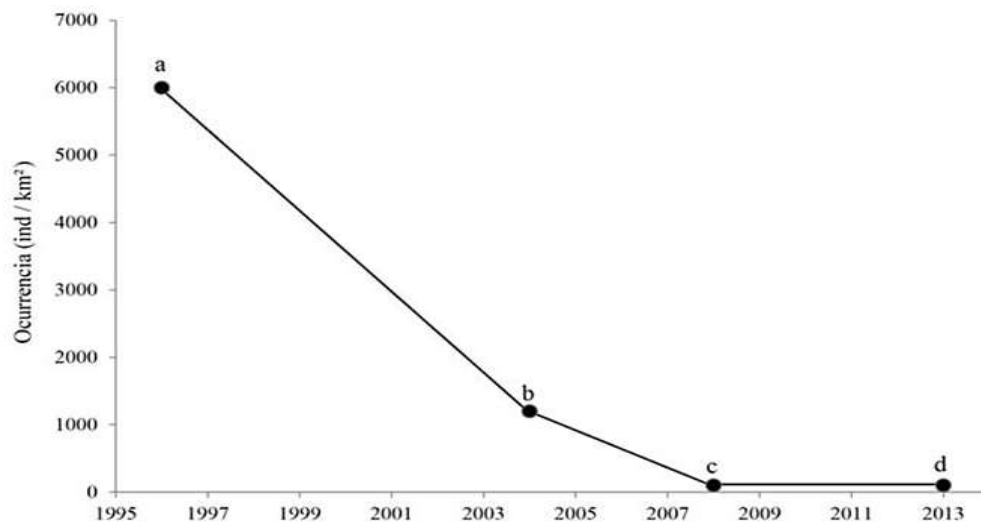


Figura 2. Ocurrencia de *Ambystoma mexicanum* desde 1996 hasta 2013 (tomado de Levy-Gálvez, 2017).

Por consiguiente y considerando que aún persistan las poblaciones silvestres de *A. mexicanum*, estas están aisladas, reducidas y dispersas, por lo que tienen dificultades para migrar y favorecer el flujo génico mediante la reproducción. La disminución del

flujo génico vulnera a los ajolotes ante las condiciones adversas que presenta su hábitat, pues potencialmente se reduce la variación genética disponible para responder a presiones selectivas en el ambiente (Contreras et al., 2009). Por lo anterior, el mantenimiento de poblaciones de *Ambystoma mexicanum* en Unidades para la Conservación, Manejo y Aprovechamiento Sustentable de la Vida Silvestre (UMA) es importante para la preservación de esta especie y específicamente, para conservar un acervo genético que en caso de que una restauración de su hábitat sea ejecutada, puedan ser reintroducidas. Así, el manejo en cautiverio puede representar una alternativa para la conservación de esta especie (CONAFOR, 2009; SEMARNAT, 2010).

No obstante, en las poblaciones en cautiverio también pueden enfrentarse problemáticas durante el manejo. Una labor fundamental es evitar la pérdida de la diversidad genética y reducir el riesgo de endogamia. Al presentarse un manejo no adecuado, se esperaría la pérdida de variación alélica, aumentando el número de homocigotos idénticos por descendencia, teniendo efectos negativos en la adecuación poblacional, principalmente en el potencial evolutivo (Witzenberger y Hochkirch, 2011). Además, una alta homocigosis puede favorecer el incremento en frecuencia de alelos recesivos deletéreos que pueden afectar negativamente la supervivencia y reproducción (Serna-Lagunes 2011); por lo que en situaciones como la de *A. mexicanum*, es urgente determinar la diversidad genética de sus poblaciones en cautiverio para establecer su estatus actual y ayudar a los programas de conservación.

Genética de poblaciones

Analizar la variación genética de las poblaciones y las causas que generan estos cambios son tareas y objetivos de la genética poblacional (Vizmanos-Pérez, 2014). Esta rama de la biología busca estimar cuál es la variación genética y las frecuencias alélicas de una población y cómo cambian a través del tiempo. Los principios de la genética de poblaciones son los mecanismos de herencia mendeliana y las fuerzas evolutivas como la mutación, el flujo génico, la selección natural y la deriva génica,

estos procesos influyen directamente sobre la diversidad genética (Hamilton, 2021) (Tabla 2).

Tabla 2. Fuerzas que generan cambios en las frecuencias alélicas (basado en Pierce, 2009).

<i>Fuerza evolutiva</i>	<i>Definición</i>	<i>Efecto dentro de la población</i>
<i>Mutación</i>	Cualquier cambio heredable en la secuencia de un gen	Aumento de la variación genética
<i>Flujo génico</i>	Movimiento e intercambio de genes entre poblaciones	Aumento de la variación genética
<i>Deriva génica</i>	Cambio de frecuencias alélicas debido a una disminución de la población por factores al azar	Disminución de la variación genética
<i>Selección natural</i>	Reproducción diferencial de un genotipo sobre otro según las condiciones ambientales	Aumento, mantenimiento o disminución de la variación genética

La herencia mendeliana asume que los rasgos son heredados por medio de los genes, que cada gen tiene dos alelos, que éstos se segregan para que cada progenitor transmita un alelo a la descendencia y que los alelos de diferente loci se transmiten de manera independiente. (Jorde et al, 2016). La selección, ya sea natural o artificial, es un proceso por el que unos fenotipos y sus respectivos genotipos dejan más descendientes que otros como consecuencia del éxito reproductivo diferencial dentro de cada población. La selección natural era considerada la fuerza principal que mantenía la variación genotípica; sin embargo, el hecho de que en las poblaciones existe una considerable variación genética no puede ser justificado solo por la acción de la selección (Tamarin et al, 2012).

La variabilidad genética en las poblaciones es explicada por la teoría neutralista de la evolución molecular propuesta por Kimura (1968). Esta teoría postula que las

mutaciones suelen ser mayormente perjudiciales, que solo unas pocas son benéficas y algunas, neutrales. La selección natural preserva o elimina las mutaciones perjudiciales y benéficas, pero la frecuencia de los alelos de las mutaciones neutrales están determinadas por la mutación y la deriva génica; algunas mutaciones neutrales se pierden, sin embargo, otras se fijan en la población, por lo tanto, la diversidad alélica se da en función de la cantidad de mutaciones neutrales y del tamaño de la población explicando el hecho de que las poblaciones más grandes tengan mayor variación genética en comparación con las poblaciones pequeñas (Klug et al, 2013).

Otro concepto fundamental en la genética poblacional es el equilibrio de Hardy-Weinberg. Este concepto se utiliza como una hipótesis nula al establecer que las frecuencias alélicas y frecuencias genotípicas se mantienen estables a lo largo de las generaciones en ausencia de factores perturbantes. Estos factores son las fuerzas evolutivas que pueden generar cambio en las poblaciones: mutación, flujo génico, apareamiento no aleatorio, selección natural y deriva génica (Millstein & Skipper, 2007). Asume que estos procesos no suceden por ende las frecuencias alélicas y genotípicas están en equilibrio. La violación de estos supuestos genera patrones que pueden ser contrastados para determinar el posible efecto de las fuerzas evolutivas sobre las poblaciones. Por lo tanto, al generarse cambio en las frecuencias alélicas a lo largo de las generaciones, puede ocurrir el cambio evolutivo. (Loo, 2011)

Evaluación de la variación genética

Para medir la diversidad genética se utilizan marcadores moleculares como los microsatélites, también llamados repeticiones de secuencias simples (SSR por sus siglas en inglés). Los microsatélites son abundantes y están distribuidos a lo largo de los genomas, son menos frecuentes en regiones codificantes y usualmente tienen altos niveles de polimorfismo (Aranguren-Méndez et al, 2005; Li et al, 2002). Están compuestos por secuencias repetidas en tándem de una a seis pares de bases con un número de repeticiones muy variable; el número de repeticiones es lo que define un alelo de un locus, por lo que cuanto mayor sea el número de alelos y el equilibrio en

sus frecuencias, más informativo es un microsatélite. Las secuencias que flanquean las repeticiones permiten analizar un locus individual a través de cebadores y la amplificación del fragmento por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) (Orengo, 2012; Cortés-Gardyn & Lucero-Casanova, 2021).

Las ventajas de usar los microsatélites como marcadores moleculares en la estimación de la diversidad genética son la alta variabilidad incluso en poblaciones con poca variación genética; la facilidad de identificación, mantenimiento, alta reproducibilidad y abundancia (Bhargava & Fuentes, 2009). Con los microsatélites se puede estimar diversos parámetros como la heterocigosidad observada (H_o) y la heterocigosidad esperada (H_e), que se calcula a partir de las frecuencias alélicas observadas en el apareamiento aleatorio, de acuerdo al equilibrio de Hardy-Weinberg (Frankham et al, 2019).

Otro aspecto importante que puede calcularse a través del uso de los microsatélites es el nivel de consanguinidad (apareamiento entre congéneres), el cual es un fenómeno inevitable en las poblaciones pequeñas como las de los ajolotes mexicanos en cautiverio y quizá actualmente en vida libre. La consanguinidad se cuantifica por medio del coeficiente de endogamia (F_{IS}) que se define como la probabilidad de que las dos copias de un alelo en determinado locus sean idénticas debido a que provienen de un ancestro común, es decir, que sea homocigoto por descendencia (Caballero-Rúa, 2017). La endogamia provoca un aumento en la cantidad de homocigotos y una reducción de heterocigotos lo que implica el aumento de alelos idéntico tanto para un determinado gen como para un conjunto de genes (Vizmanos-Pérez, 2014).

Por otro lado, la endogamia puede llevar a un vórtex de extinción, que es cuando una población reducida (ya sea por factores ambientales, aleatorios o antropogénicos) aumenta inexorablemente su índice de endogamia, lo que conlleva a una reducción de la población, que eventualmente aumentará el nivel de endogamia, llegando a una depresión por endogamia. En otras palabras, se manifiesta como una disminución de

la adecuación de los individuos dada por la consanguinidad en comparación con los individuos no consanguíneos aumentando la probabilidad de alelos recesivos perjudiciales se expresen en la descendencia (Frankham et al, 2019).

Genética de la conservación

La evolución depende en gran medida de la variabilidad genética, por lo que para favorecer la conservación de especies es importante mantener la variación genética en las poblaciones o dentro de la especie. Diferentes niveles de variación genética tienen diferentes respuestas ante fenómenos como la selección, la endogamia, la deriva génica y la fragmentación, por lo que conservar la diversidad genética es importante para que las especies mantengan su capacidad y potencial de adaptación y, de esta manera, reducir el riesgo de su extinción (Woodruff, 2001; Loo, 2011).

La genética de la conservación es la disciplina que conjuga el uso de la teoría evolutiva y la genética de poblaciones para reducir el riesgo de extinción de las especies amenazadas. Utiliza análisis genéticos moleculares para dilucidar los aspectos biológicos de las especies con poblaciones pequeñas que son relevantes para la gestión de su conservación (como patrones de migración y reproducción, así como los efectos de la endogamia, la pérdida de la diversidad genética, la deriva génica o la acumulación de mutaciones deletéreas (Frankham, 2003). También, ayuda a identificar especies o poblaciones en riesgo de extinción debido a la pérdida de diversidad genética y a proponer medidas de manejo para minimizar la pérdida de la diversidad genética y el efecto negativo de la endogamia (Frankham et al, 2004). La genética de la conservación se encarga de encontrar los medios más efectivos para preservar la diversidad genética e identificar las unidades de conservación (Figura 3) como:

- a) Las unidades significativas evolutivas (ESU), que priorizan la protección de grupos recíprocamente monofiléticos para alelos de mtADN restringidos geográficamente, con una historia evolutiva-genética única, por lo cual se

necesita protección exclusiva para cada grupo (Moritz, 1994 y Manel et al., 2003).

- b) Las unidades de manejo (MU), favorecen la conservación de grupos de poblaciones entre las que el grado de conectividad es tan bajo que cada grupo debe ser monitoreado y manejado por separado, dando seguimiento a cambios en la variabilidad genética a corto plazo (Taylor y Dizon, 1999).
- c) Las redes familiares (FN), evalúan prácticas de manejo estableciendo el parentesco e identificando individuos para poder minimizar la reproducción entre congéneres (Wan et al. 2004).
- d) Las unidades de acción (AU) están dirigidas a poblaciones que necesiten planes de protección inmediatos debido al riesgo de extinción que enfrentan. En estas AU es preciso determinar la pérdida de diversidad genética y la variación entre las poblaciones para establecer programas de reintroducción de organismos o fusiones de acervos genéticos, incluyendo los planes de reintroducción de poblaciones provenientes de cautiverio. Por consiguiente, el uso de microsatélites es ideal para las UA, pues éstos reflejan patrones genéticos de poblaciones tanto en vida silvestre como en cautiverio (Qiu-Hong et al, 2004)

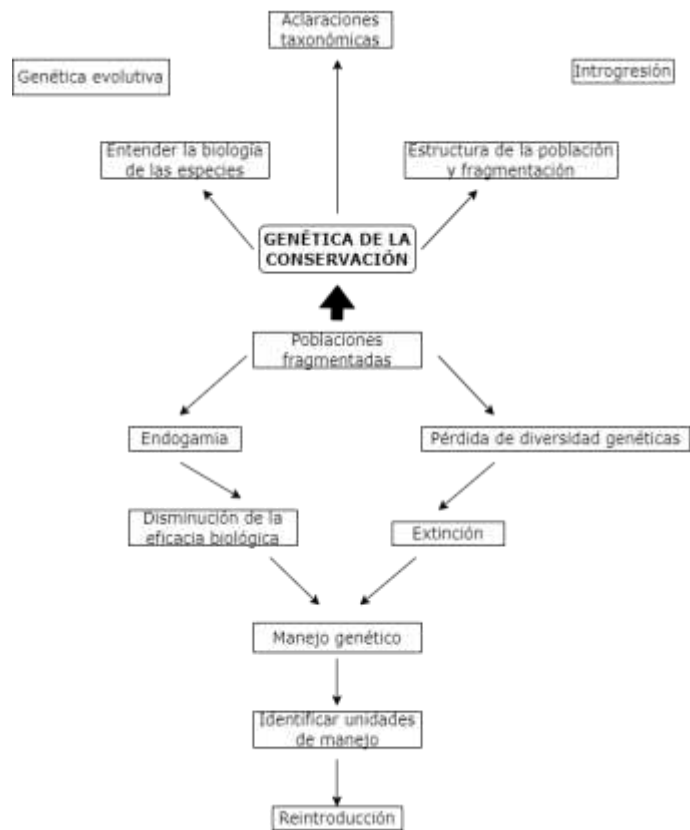


Figura 3. Implicaciones y objetivos de la genética de la conservación (tomado de Souty-Grosset, 2003).

ANTECEDENTES

De manera general, se han realizado varios estudios genéticos sobre el ajolote mexicano, la mayoría están enfocados a la expresión genética de ciertos genes que están relacionados con las características neoténicas y la capacidad de regeneración (por ejemplo, Monaghan et al., 2007; Huggins et al., 2012; Espinal-Centeno et al., 2020). En particular, Monaghan et al. (2007) determinaron los genes que se expresaban durante la regeneración natural de la médula espinal, para identificar los genes similares que podrían estar activados o apagados en lesiones de médula espinal en mamíferos. Huggins et al. (2012) identificaron genes sensibles a la hormona tiroidea expresados en el cerebro del ajolote mexicano, tanto en estado adulto como juvenil, para determinar las afectaciones en la actividad de los ejes neuroendocrinos

Recuero et al. (2010) analizaron la variabilidad genética de las poblaciones silvestres de *A. mexicanum* utilizando ADN mitocondrial y con muestras del 2005 de tres localidades (lago viejo Chapultepec, Xochimilco y Chalco), donde determina por primera vez la variabilidad genética de poblaciones silvestres de esta especie, enocntrando una baja diversidad genética.

Parra-Olea et al. (2007) diseñó marcadores moleculares polimórficos utilizados en los estudios de genética de poblaciones del complejo de salamandras tigre del género *Ambystoma*, a partir de las regiones flanqueantes (*primers*) de 49 microsatélites, identificaron nueve loci (Atig52.143, Atig52.115, At52.1, At60.3, At52.2, At52.20, At52.6, At52.34 y At52.10) con concentración alta de producto PCR y polimorfismo. Estos autores analizaron 24 individuos de *A. mexicanum*, obteniendo 46 alelos en total y una heterocigosidad observada entre 0.045 y 0.632 para cada locus; sin embargo, para el locus At52.10 solo se tuvo un alelo y la heterocigosidad fue de 0 (Parra-Olea et al, 2007).

A partir del diseño de estos microsatélites, Parra-Olea et al. (2011) analizaron seis especies de *Ambystoma*, incluyendo *A. mexicanum* en el lago de Xochimilco y el lago viejo de Chapultepec. Parra-Olea et al. (2011) observaron que *A. mexicanum* presenta

altos niveles de parentesco entre sus individuos y muestran un alto potencial de endogamia, aunque no se tiene evidencia de que esto ocasione efectos negativos en la eficacia biológica de los organismos; además encontraron entre cinco y seis alelos y se observó un déficit de heterocigotos.

Los estudios genéticos en individuos en cautiverio son muy escasos, se realizó una búsqueda intensiva y solo se encontró uno por Graue (1998), que utilizó aloenzimas como marcador molecular. Este estudio se realizó en la colonia de *A. mexicanum* de la Universidad de Indiana que ahora lleva el nombre de Ambystoma Genetic Stock Center (AGSC) y que pertenece a la Universidad de Kentucky. El estudio reveló que la endogamia fue baja, así como el valor del promedio del coeficiente de endogamia para esta colonia, que entonces contaba con aproximadamente 500 ejemplares. En la actualidad, la colonia consta de aproximadamente 1206 individuos y se reporta un coeficiente de endogamia promedio de 0.35 (un coeficiente mayor a 0.125 indica una situación de riesgo). Además, se estimaron 5.82 genomas fundadores de la colonia, similar a la población fundadora de París de 1863, de donde provienen los primeros individuos de ajolotes del AGSC. Una de las causas de los altos niveles de endogamia en la colonia del AGSC se adjudica a que las introducciones de ajolotes que ha habido a lo largo del tiempo (1998) en esta colonia también provienen de los ajolotes llevados con anterioridad a Francia (1863) (Voss et al, 2015).

Colonia de *A. mexicanum* en la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) de la FES Iztacala, UNAM.

La UMA de ajolote mexicano (*A. mexicanum*) de la FES Iztacala se inauguró entre 1995 y 1996 con el objetivo de estandarizar técnicas de mantenimiento y crianza, así como producirlos para ofrecerlos como animales de laboratorio (Maya-Pérez, 2003). En la actualidad este objetivo ha cambiado y tiene como prioridad la conservación *ex situ* de la especie (Correa-Sánchez *com. pers*).

No se tiene precisión del número de ejemplares de la población fundadora; de acuerdo a la literatura consistió entre nueve y 20 ejemplares traídos de Cuemanco, Xochimilco, y algunos rescatados del mercado ilegal (Uribe-García, 2002; Maya-Pérez, 2003; Maya-Monroy, 2006; Estrada-Romero, 2015). De acuerdo a lo reportado en otros estudios, esta colonia de ajolotes ha sufrido cambios importantes en su abundancia, en el 2002 al menos seis ejemplares provenientes de una UMA de Xalapa fueron añadidos a la colonia y para entonces se tenían en cautiverio 900 ejemplares (pico más alto de abundancia). En la actualidad la colonia consta de 100 individuos con una edad promedio de 4 años aproximadamente y un mayor porcentaje de hembras (Figura 4) (Uribe-García, 2002; Maya-Pérez, 2003; Maya-Monroy, 2006; Estrada-Romero, 2015). Estas fluctuaciones en la abundancia, se debe a que desde la creación de la UMA se han observado muertes masivas, en las larvas las causas principales fueron lesiones digestivas y septicemias; la presencia de parásitos en el alimento que se les suministraba afectó tanto a las larvas como a los organismos adultos (Maya-Monroy, 2006).

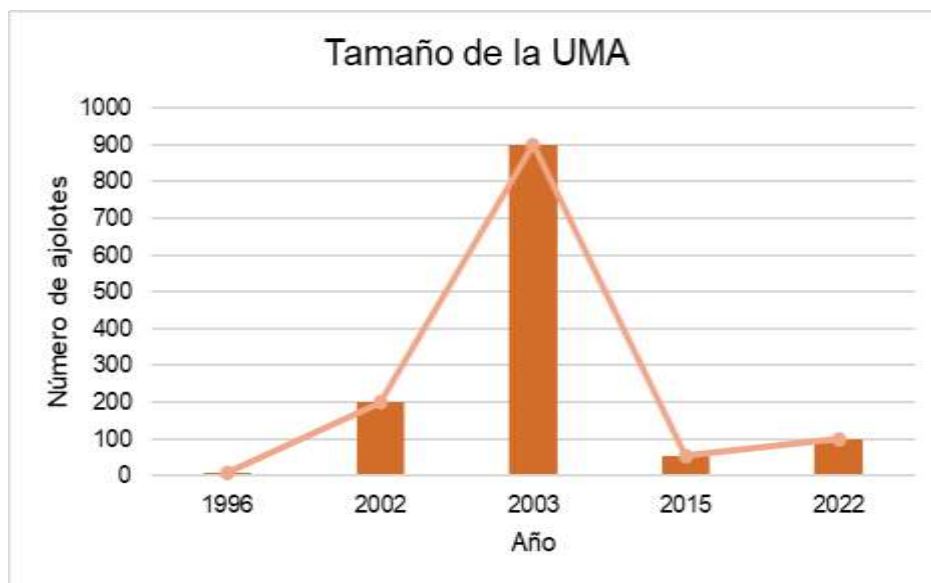


Figura 4. Número de ajolotes de la UMA de la FES Iztacala desde su fundación hasta la actualidad (1996-2023).

La colonia de ajolotes de la FES Iztacala o Ajolotario ha tenido introducciones e intercambio de ajolotes con otras instituciones a lo largo de su historia, lamentablemente no se tiene un registro de fechas, número de organismos o las colonias de las que provienen individuos a la UMA (Correa-Sánchez *com. pers*). Por lo tanto, es muy importante y esencial determinar la diversidad genética de la UMA, ya que no solo se trata de conservar la especie, sino también la variabilidad genética para evitar procesos endogámicos que pongan en riesgo esta colonia de ajolotes en el futuro. El presente trabajo se basa en las unidades de acción (AU) en lo que respecta a la primera etapa, que consiste en estimar la diversidad genética de una especie en cautiverio para que en un futuro se pueda hacer fusiones de acervos genéticos con otras UMAs y mantener la variabilidad genética del *A. mexicanum*.

HIPÓTESIS

De acuerdo al historial del *Ambystoma mexicanum* (ajolote mexicano) en la UMA FES Iztacala, donde no se conoce el registro en la colonia de intercambios o introducciones de individuos y aunado a esto las fluctuaciones históricas en la abundancia debido a muertes masivas tanto en larvas como en ajolotes adultos, se esperaría una diversidad genética baja y una probabilidad alta de endogamia.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar y analizar la variabilidad genética de la colonia del ajolote mexicano (*Ambystoma mexicanum*) en la UMA del vivario de la FES Iztacala para conocer su diversidad genética con el fin de contribuir a la conservación de la especie

OBJETIVOS PARTICULARES

- Estimar la diversidad genética de la población en cautiverio de *Ambystoma mexicanum*.
- Estimar los niveles de endogamia de la población en cautiverio de *Ambystoma mexicanum*, para conocer el estado de la diversidad genética.
- Determinar el estado de conservación de la población en cautiverio de *Ambystoma mexicanum*, para ayudar en futuros programas de conservación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Colecta de muestras y extracción de DNA

Las muestras fueron tomadas de 20 organismos de *Ambystoma mexicanum* de la UMA del Laboratorio de Herpetología de la FES Iztacala (Figura 5). La selección de los individuos fue realizada con el personal del Laboratorio de Herpetología, en esta selección se tuvo la representatividad de las familias de ajolotes presentes en la UNAM.

A los individuos seleccionados se les hizo un corte en la parte posterior de la cola de aproximadamente 1 cm y se extrajo una muestra de tejido. Estos tejidos se almacenaron en etanol al 90% y se mantuvieron a una temperatura de -20°C para su conservación.

Para la extracción del ADN genómico total del tejido se utilizó el método de digestión estándar de proteinasa K/SDS mediante el DNeasy Blood & Tissue Kit de Qiagen, siguiendo el protocolo del fabricante. Para comprobar la extracción y visualizar el ADN, se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio y revelado con luz ultravioleta, incluyendo una escalera molecular como referencia de 1000 pb (Rivera-Ortíz et al. 2017).



Figura 5. Ejemplar de *A. mexicanum* de la UMA de la FES Iztacala.

Amplificación ADN

Se utilizaron cinco loci (At52.10, Atig52.41, Atig52.86, Atig60.156 y Atig52.118) desarrollados para el complejo *Ambystoma tigrinum tigrinum* por Parra-Olea et al. (2007), pero solo el locus At52.10 está publicado, el resto fueron desarrollados por Parra-Olea pero no incluidos en la publicación debido a que no mostraron niveles adecuados de polimorfismo para todo el complejo, pero sí para *A. mexicanum* (Parra-Olea *com. pers.*). Se realizaron ensayos con los cinco loci para conocer las condiciones y estandarizaron las temperaturas correctas de amplificación (Tabla 3).

Tabla 3. Secuencia, tamaño y temperatura estandarizada para la amplificación de cada primer.

Primer	Secuencia repetida	Tamaño (pb)	Temp
At52.10	F: GGTGCAACGAGGCAGTTTTTACCTATTT R: GTCGCTCCTTTCCCTAAGCAAAGCTGAT	224.32-230.81	56°C
Atig52.118	F: TTTTGCATTTATATAGTGCCGTAT R: ACACGAATGTCACACCTGCT	152.33-161.37	52°C
Atig52.41	F: TGTTTTCGGCCAGTTAACTCTA R: AAGGAGCCTGGAAATACTATGA	230.18-239.71	56°C
Atig52.86	F: CCTCTTCTGGGCTTGTCTGC R: GGGGTGGGATTTGCCTGAG	204.47-210.92	54°C
Atig60.156	F: AGGTGAGTCTGGGCTTCAA R: GCACGCACCAGATAGGTGTA	199.62-207.48	56°C

La amplificación del ADN se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para cada PCR se colocaron 2µl de ADN, 2µl de cada primer, 6.5µl de agua y 12.5µl de PCR mix. Los ciclos se basaron en los descritos para el género *Ambystoma* por Parra-Olea et al. (2007): un paso de desnaturalización a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 60 segundos, fase de alineación a la temperatura correspondiente de cada primer por 60 segundos, elongación a 72°C por 90 segundos y un último paso a 72°C por 30 minutos.

Los análisis electroforéticos se llevaron a cabo en el Instituto de Biología de la UNAM en el secuenciador DNA ABI PRISM 377, usando un GeneScan LIZ 500. En cada pozo se colocaron 10 μ l de formida Hi-Di, 0.3 μ l de LIZ y 1 μ l del producto PCR.

Análisis de datos

Para conocer la presencia de alelos nulos se utilizó el programa Micro-Checker 2.2 (Van Oosterhout et al. 2004). Los alelos nulos en las regiones de microsatélites pueden surgir a través de mutaciones puntuales en el sitio de acoplamiento de los iniciadores, la presencia de estos alelos nulos son el principal problema en estudios de genética poblacional, si hay presencia de alelos nulos y no se consideran en los resultados, se tendrá un error de conteo excesivo de homocigotos (Li et al., 2003).

Se estimó para cada locus y para la colonia de ajolote mexicano el número de alelos (N_a), que es una medida de diversidad alélica estandarizada a un tamaño de muestra particular; número efectivo de alelos (N_e), que son alelos encontrados exclusivamente en la población; heterocigotos observados (H_o), que es una proporción de los individuos heterocigotos encontrados en la población; heterocigotos esperados (H_e), que son los genotipos heterocigotos esperados para una población con apareamiento aleatorio con las frecuencias alélicas dadas según el equilibrio de Hardy-Weinberg). También se estimó la desviación del equilibrio Hardy-Weinberg (HW) utilizando el software GenAlex 6.5 (Peakall & Smouse, 2006), así como el coeficiente de endogamia también calculado para cada locus y para la colonia de *A. mexicanum* (F_{IS}) por medio del software Genetix 4.05.

RESULTADOS

Se analizaron 20 muestras de ajolote mexicano. De los cinco *primers* de microsatélites, los loci At52.10 y Atig52.41 mostraron tener presencia de alelos nulos, y se confirmó el exceso de homocigotos. Para el caso del marcador At52.10 tuvo un coeficiente de endogamia de 0.63810, mientras que para el marcador Atig52.41 tuvo un coeficiente de 0.74324, por lo tanto, estos loci fueron excluidos de los análisis estadísticos.

El alelo con mayor frecuencia fue el 207 del locus Atig60.156. Por otro lado, los alelos con menor frecuencia fueron el 153 del locus Atig52.118 y el 204 del locus Atig52.86 (Figura 5). El 36% de los alelos tienen una frecuencia alélica menor a 0.1; tres clases que van de 0.2-0.3, 0.3-0.4 y 0.4-0.5 tienen un porcentaje del 18.2% (Tabla 4).

Tabla 4. Frecuencias alélicas.

Locus	Alelo	Frecuencia
Atig58.118	152	0.475
	153	0.025
	161	0.475
	162	0.025
Atig52.86	204	0.025
	205	0.325
	206	0.075
	210	0.300
	211	0.275
Atig60.156	200	0.219
	207	0.781

La colonia de la UMA de ajolote mexicano de la FES Iztacala presentó en promedio una riqueza de 3.667 alelos y un número efectivo de alelos de 2.444. El locus con mayor riqueza alélica (cinco alelos) y alelos efectivos (3.604) fue Atig52.86; el locus con menor riqueza alelica (dos alelos) y alelos efectivos (1.519) fue Atig60.156 (Tabla 5).

Para la colonia el número de heterocigotos esperados (He) fue de 0.537 y el número de heterocigotos observados (Ho) de 0.763. El locus Atig52.118 mostró una desviación del equilibrio Hardy-Weinberg, mientras que los loci Atig52.86 y Atig60.156 no mostraron una diferencia significativa (Tabla 5).

El coeficiente de endogamia para la colonia fue de -0.39639. El locus Atig52.86 presentó una endogamia de -0.15152, para el locus Atig60.156 fue de -0.25000, y para el locus Atig52.118 fue de -0.81818 (Tabla 5).

Tabla 5. Número de individuos de *Ambystoma mexicanum*(N), número de alelos (Na), número efectivo de alelos (Ne), heterocigotos observados (Ho), heterocigotos esperados (He), coeficiente de endogamia (F_{IS}) desviación del equilibrio Hardy-Weinberg (HW).

Primer	N	Na	Ne	Ho	He	F_{IS}	HW
Atig52.118	20	4	2.210	1	0.548	-0.818	P<0.001
Atig52.86	20	5	3.604	0.850	0.723	-0.151	-
Atig60.156	20	2	1.519	0.438	0.342	-0.025	-
Colonia de ajolotes		3.667	2.444	0.763	0.537	-0.396	

DISCUSIÓN

Los *primers* utilizados en este estudio fueron desarrollados para las especies del complejo *Ambystoma tigrinum* por Parra-Olea et al. (2007), linaje al cual pertenecen todas las especies registradas en México. Los loci Atig52.118, Atig52.86 y Atig60.156 fueron descartados para su publicación debido a que el producto de PCR de éstos no tuvo buena concentración y no mostraron niveles de polimorfismo adecuados en las pruebas piloto para todo el complejo. Sin embargo, en el presente estudio estos microsatélites se probaron para la especie de *A. mexicanum* teniendo una amplificación de ADN por medio de la PCR, no hubo presencia de alelos nulos, contaron con polimorfismo y heterocigosidad, por lo que son aptos para estudios de diversidad genética al menos en *A. mexicanum*.

En los loci At52.10 y Atig52.41 hubo presencia de alelos nulos y deficiencia de heterocigotos. El locus Atig52.41 fue descartado en las pruebas piloto hechas por Parra-Olea et al. (2007). El locus At52.10 pasó las pruebas piloto y fue publicado, pero mostró monomorfismo, por tanto, nula heterocigosidad para *A. mexicanum*. Para otras especies del complejo como *A. andersoni* y *A. rivulare*, también se encontró presencia de alelos nulos, baja riqueza alélica y déficit de heterocigotos en locus At52.10. Además, se ha reportado que tiene una baja tasa de mutación (Parra-Olea et al, 2007; Parra-Olea et al, 2012; Heredia-Bobadilla et al, 2016; Bulut et al, 2008), por lo que no es apto para todas las especies del complejo salamandra tigre incluido el *A. mexicanum*.

Número de alelos

Los microsatélites dinucleótidos suelen tener entre 10 y 15 alelos por locus y se ha observado que las especies de animales en peligro de extinción en promedio poseen menos de cinco alelos por locus (Woodruff, 2001; Qiu-Hong et al, 2004). El promedio de alelos por locus y el número totales de alelos fueron 11 y 3.667 respectivamente, que son considerados bajos; estos resultados muestran una riqueza alélica parecida

a la población silvestre de *A. mexicanum*, que tiene alrededor de tres alelos promedio, y es ligeramente mayor que en especies con pedomorfosis obligada como *A. andersoni* que cuenta con menos de tres alelos promedio (Parra-Olea et al, 2012).

El número de alelos en la colonia ajolotes mexicanos de la UMA de la FES Iztacala, fue menor que en la población de *A. mexicanum* de Xochimilco, que cuenta con aproximadamente cinco alelos promedio. En otras especies pertenecientes al complejo *A. tigrinum tigrinum*, el número de alelos promedio fue muy similar o mayor (ver Parra-Olea et al., 2012; Sunny, et al., 2014; Heredia-Bobadilla et al., 2016; Heredia-Bobadilla et al., 2017; Monroy-Vilchis et al., 2019).

Estos valores encontrados en la colonia de ajolotes mexicanos de la UMA de la FES Iztacala podría ser resultado de varios factores: i) la colonia debido al aprendizaje en el mantenimiento en cautiverio ha presentado fluctuaciones en su abundancia provocadas por la mortalidad de larvas y adultos (Maya-Pérez, 2003; Maya-Monroy, 2006), lo que pudo conllevar a reducciones importantes en sus valores de riqueza alélica en la colonia; ii) el número de alelos bajo también corresponde con la pérdida de la riqueza alélica en la especie y al ser un valor similar a otras especies del complejo *A. tigrinum* en poblaciones silvestre. Esto sugiere que esta pérdida puede ser histórica, especialmente en las especies con pedomorfosis obligada, pues restringe la historia de vida y los hace más susceptibles a eventos de deriva génica y a un menor flujo génico (Parra-Olea, et al, 2012).

A pesar de la alta diversidad genética en algunas especies de ajolotes en México, se ha observado una reducción de ésta que se refleja en la baja cantidad de alelos presentes, lo cual se debe principalmente a la alteración, contaminación y explotación de sus hábitats, los vuelve organismos vulnerables. En el caso de *A. mexicanum*, la baja riqueza alélica podría deberse tanto a la condición actual de la reducción de sus poblaciones silvestres, como a la cautividad, ya que está comprobado que ambas circunstancias reducen la riqueza alélica (Frankham, 2008).

Los resultados muestran que no hay pérdida de alelos raros (con frecuencias menores a 0.1), pero sí hay un cambio en la distribución de las frecuencias alélicas, lo que podría ser un indicio de un cuello de botella; esto concuerda con la historia de las fluctuaciones que ha tenido la abundancia de esta colonia, ya que se han registrado muertes masivas, como fue caso del año 2003 donde se tenía registro de 900 ejemplares. En la actualidad, hay 100 individuos en la colonia que representan una reducción del 88.8%; sin embargo, para contar con una mayor certeza es necesario el uso de más loci (microsatélites), así como tomar con precaución de los locus que no estén en equilibrio de Hardy-Weinberg (Luikart et al, 1998).

Heterocigosis y endogamia

En el locus Atig52.118 se encontró desviación en el equilibrio Hardy-Weinber debido a un exceso de heterocigotos, con una heterocigosidad observada casi del doble del valor que la esperada. Esto indica que solo en este locus hay evidencia de que ha actuado alguna(s) de las fuerzas evolutivas (Graue, 1998). Además, la colonia ha estado sometida a condiciones que generan cambios en el equilibrio de Hardy-Weinberg como el hecho de que ha habido entrada de individuos a lo largo del tiempo por lo que ha existido un intercambio e introducción de alelos y la reproducción no ha sido al azar ya que se ha evitado el cruzamiento de ejemplares con mayor parentesco (Vizmanos-Pérez, 2013). En cambio, en los loci Atig52.83 y Atig.60.156 no se encontró desequilibrio, pues los valores de heterocigosidad observada y esperada fueron similares.

Para la colonia de ajolotes mexicanos de la FES Iztacala, la heterocigosidad observada (H_o) de 0.763 fue mayor que la heterocigosidad esperada (H_e) de 0.537. Los resultados son mayores que los de poblaciones silvestres de *A. mexicanum*, pero son similares a algunas poblaciones de otras especies de *Ambystoma* como *A. rivulare* ($H_o=0.761$) y *A. altamirani* ($H_o=0.788$), mientras que en otras poblaciones estos valores son aún mayores como en *A. altamirani* ($H_o=0.870$) y *A. leorae* ($H_o=0.804$)

(Parra-Olea et al., 2012; Sunny, et al., 2014; Heredia-Bobadilla et al., 2016; Heredia-Bobadilla et al., 2017; Monroy-Vilchis et al., 2019).

Los niveles de heterocigotos son generalmente moderados o altos en el género *Ambystoma*, esto muestra que cuenta con una alta diversidad genética a pesar de tener hábitats fragmentados y limitados, lo que podría estar relacionado a un tamaño poblacional grande en el pasado reciente, un tamaño fundador alto o la presencia de polimorfismos ancestrales (Sunny et al, 2014). Los polimorfismos ancestrales son comunes en grupos de especies que han radiado recientemente, como los ejemplares del complejo *A. tigrinum*, y que además han contado con tamaños poblacionales grandes y que la selección ha favorecido el polimorfismo, lo que es más frecuente cuando los organismos se ven expuestos a cambios constantes en el ambiente como es el caso de los ajolotes (Guerrero & Hahn, 2017). También se ha reportado que los ajolotes han sufrido reducción en sus poblaciones de manera histórica, por lo que el polimorfismo y la heterocigosis han podido ser favorecidos por la selección natural (Heredia-Bobadilla et al, 2017; Recuero et al., 2010).

En cuanto al coeficiente de endogamia, los ejemplares del Ajolotario de la FES Iztacala, presentó valores moderados, esto puede explicarse por el intercambio de individuos de la UMA con otras poblaciones en cautiverio y la introducción de nuevos organismos a lo largo del tiempo (lamentablemente no se tiene registro exacto), pues la translocación de individuos en colonias en cautiverio tiene beneficios como conservar la diversidad genética, reducir la adaptación genética la cautiverio y mantener niveles de endogamia aceptables (Frankham, 2008). Otra explicación puede ser que la colonia cuenta con tan solo 25 años de su existencia y que los ajolotes fundadores fueron capturados cuando la densidad poblacional en Xochimilco era más alta (de 6,000 individuos por kilómetro cuadrado) y posiblemente también al manejo de reproducción y a la supervivencia de los individuos no consanguíneos. Además, la endogamia en otras especies de *Ambystoma* con poblaciones silvestres también es baja, por lo que la diversidad propia del género puede ser otro factor importante en estos resultados.

Implicaciones para la conservación

La conservación del ajolote mexicano en cautiverio puede tener diversas implicaciones, tanto positivas como negativas, dependiendo de cómo se manejen las condiciones y cuidados para estos animales. Una de las implicaciones positivas del cautiverio es que puede ser una herramienta importante para proteger a los ajolotes de la extinción, ya que les proporciona un ambiente controlado y seguro en el que pueden vivir y donde todos los organismos viables tendrán la oportunidad de reproducirse sin correr el peligro al que están expuestos en la vida silvestre como los depredadores y la pérdida de su hábitat natural. Otra ventaja del cautiverio es que permite a los científicos aprender más sobre su biología, comportamiento y necesidades, lo que es útil para desarrollar estrategias de conservación y manejo en su hábitat natural (Witzenberger & Frankham et al., 2004). Por otro lado, las implicaciones negativas son que los ajolotes pueden desarrollar problemas de salud en el cautiverio, especialmente si no cuentan con características similares a las de su ambiente natural o una alimentación adecuada. También pueden existir problemas genéticos en las colonias de ajolotes debido a la endogamia y la falta de variabilidad genética, situación que por el momento y basado en los marcadores utilizados no se registró en el presente trabajo. Por lo que su mantenimiento en cautiverio tiene que contemplar los análisis de diversidad genética para establecer planes de manejo sobre la reproducción, la translocación de individuos y asegurar el acervo genético que incremente su viabilidad en el futuro (Frankham, 2008).

En general, mantener a *A. mexicanum* en cautiverio es una herramienta valiosa para su protección y conservación, pero para ello es necesario brindarles las condiciones adecuadas, contar con planes de manejo apropiados y llevar un registro de éstos, así como la aplicación de la genética poblacional para asegurar el bienestar y la supervivencia de los ajolotes. Además, es importante considerar que la conservación en cautiverio debe ser complementaria a los esfuerzos de conservación y restauración

de su hábitat natural, ya que no es posible sustituir la continuidad de los procesos ecológicos y evolutivos de esta especie en cautiverio.

CONCLUSIONES

- Los microsatélites Atig52.118, Atig52.86 y Atig60.156 son óptimos para estudios de genética poblacional en *A. mexicanum*, mientras que los loci At52.10 y Atig52.41 no son aptos para esta especie.
- La colonia de *A. mexicanum* de la FES Iztacala cuenta con baja riqueza alélica, que puede tener diferentes causas como las muertes masivas que tuvieron lugar entre 2003 y 2006, la condición de peligro de extinción de la especie y la pérdida histórica de alelos presente en el género.
- La heterocigosidad observada es elevada y mayor a la esperada, esto parece ser característica de las especies del complejo *A. tigrinum* como resultado de tamaño poblacional grande en el pasado, la presencia de polimorfismos ancestrales y el favorecimiento de la heterocigosis y el polimorfismo por la selección natural.
- Hay poca ocurrencia de endogamia en la colonia de la FES Iztacala, donde la traslocación e introducción de individuos, el manejo de reproducción, la supervivencia de los individuos no consanguíneas y la edad joven de la colonia han mantenido la endogamia en niveles aceptable y favorables.
- El mantenimiento de ajolotes en cautiverio es importante para la conservación de la especie si se tienen planes de manejo adecuados en los que se han incluido estudios de genética poblacional.

REFERENCIAS

- Aranguren-Méndez, J. A., Román-Bravo, R., Isea, W., Villasmil, Y. & Jordana, J. (2005). Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* 13(1): 30-42
- Ávila-Akerberg, V., D., González-Martínez, T., M., González-Hernández, A. & Vázquez-Trejo, M. (2021). El género *Ambystoma* en México ¿Qué son los ajolotes? *Revista Científica Multidisciplinaria de Prospectiva*. 28, 2, 1
- Ávila-Nájera, D. M., Mendoza, J. D., Villarreal O., Serna-Lagunes R. (2018) Uso y valor cultural de la herpetofauna en México: una revisión de las últimas dos décadas (1997–2017). *Acta Zoológica Mexicana* (nueva serie), 34, 1–15. <https://doi.org/10.21829/azm.2018.3412126>
- Bhargava, A., Fuentes, F. F. (2009). Mutational Dynamics of Microsatellites. *Molecular Biotechnology*. 44(3):250-66
- Bulut, Z., McCormick, C. R., Gopurenko, D., Williams, R. N., Boss, D. H., DeWoody, J. A. (2008). Microsatellite mutation rates in the eastern tiger salamander (*Ambystoma tigrinum tigrinum*) differ 10-fold across loci. *Genetica*, 136(3), 501-504. DOI 10.1007/s10709-008-9341-z
- Caballero-Rúa, A. (2017). *Genética cuantitativa*. Madrid: Editorial Síntesis.
- Canseco-Márquez, L. & Gutiérrez-Mayén, M., G. (2010). *Anfibios y Reptiles del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), Fundación para la Reserva de la Biosfera Cuicatlán, A. C, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
- Chanson, J., Hoffman, M., Cox, N., Stuart, S. (2008) The state of the world's amphibians. En S.N. Stuart, M. Hoffmann, J.S. Chanson, N.A. Cox, R.J. Berridge, P. Ramani, and B.E. Young (Eds.), *Threatened amphibians of the world* (pp. 33-44). Lynx Edicions.

- Cole, L. A. (2007). *A Phylogeny of Mexican Ambystoma Salamanders (Caudata: Ambystomatidae) From Larval Characters*. (Tesis de maestría, Florida Atlantic University)
- Collins, J. P. (2010). Amphibian decline and extinction: What we know and what we need to learn. *Diseases of Aquatic Organisms*. Vol. 92: 93–99, 2010
- CONAFOR. (2009). *Manual técnico para beneficiarios: Manejo de vida silvestre*. Coordinación General de Educación y Desarrollo Tecnológico
- Contreras, V., Martínez-Meyer, E., Valiente, E. & Zambrano, L. (2009). Recent decline and potential distribution in the last remnant area of the microendemic Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Biological Conservation*. 142, 2881-2885
- Cordier, J. M., Aguilar, R., Lescano, J. N., Leynaud, G. C., Bonino, A., Miloch, D., Loyola, R., & Nori, J. (2021). A global assessment of amphibian and reptile responses to land-use changes. *Biological Conservation*, 253, 108863. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108863>
- Corn, P. S., 2005. Climate change and amphibians. *Animal Biodiversity and Conservation*, 28.1: 59–67
- Cortés-Gardy, O. & Lucero-Casanova, C. E. (2021). Marcadores Moleculares de ADN. En: Tibaduiza Castañeda, L. P. & Jiménez Sabogal, H. R. (Comp.). *Recursos zoogenéticos: conservación, caracterización y gestión de su biodiversidad*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA).
- Crump, M. L. (2009). Amphibian diversity and life history. En: Dodd Jr, C. K. (Ed.). *Amphibian Ecology and Conservation: A Handbook of Techniques*. New York: Oxford University Express.
- Estrada-Romero, R., M. (2015). *El ajolote Ambystoma mexicanum: su manejo y reproducción en cautiverio*. (Tesis de licenciatura) Universidad Nacional Autónoma de México.
- Everson, K., Gray, L. N., Jones, A. G., Lawrence, M. N., Foley, M. E., Sovacool, K. L., Kratovil, J. D., Hotaling, S., Hime, P. M., Storfer, A., Parra-Olea, G.,

Percino-Daniel, R., Aguilar-Miguel, A., O'Neill, E. M., Zambrano, L., Bradley Shaffer, H., Weisrock, D. W. (2021). Geography is more important than life history in the recent diversification of the tiger salamander complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 118 No. 17 e2014719118

- Frankham, R. (2003). Genetics and conservation biology. *Comptes Rendus Biologies*, 326, 22-29. [https://doi.org/10.1016/s1631-0691\(03\)00023-4](https://doi.org/10.1016/s1631-0691(03)00023-4)
- Frankham, R., Ballou, J. D., Ralls, K., Eldridge, M. D. B., Dudash, M. R., Fenster, C. B., Lacy, R. C., & Sunnucks, P. (2019). Inbreeding and loss of genetic diversity increase extinction risk. *A Practical Guide for Genetic Management of Fragmented Animal and Plant Populations*, 31-48. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198783411.003.0003>
- Frankham, R., Ballou, J. D., Briscoe, D. A. (2004). *A Primer of Conservation Genetics*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Frankham, R. (2008). Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. *Molecular Ecology*. 17, 325-333.
- Frías-Álvarez, P. & Flores-Villela, O., A. (2010). A general assessment of the conservation status and decline trends of Mexican amphibians. *Biodiversity and Conservation*. 19:3699–3742
- Graue Wiechers, Virginia. (1998). *Estudio genético y demográfico de la población del anfibio *Ambystoma mexicanum* (Caydata : *Ambytomatidae*) del Lago de Xochimilco*. (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Griffiths, R. A., Graue, V., Bride, I. G., & McKay, J. E. (2004). Conservation of the axolotl (*Ambystoma mexicanum*) at Lake Xochimilco, Mexico. *Herpetological Bulletin*. 89, 4-11
- Guerrero, R. & Hahn, M. W. (2017). Speciation as a sieve for ancestral polymorphism. *Molecular Ecology*. 26:5362–5368.
- Hamilton, M. B. (2021). *Population Genetics*. India: Johny Wiley & Sons Inc.

- Heredia-Bobadilla, R. L., Monroy-Vilchis, O., Zarco-González, M. M., Martínez-Gómez, D., Mendoza-Martínez, G. D., & Sunny, A. (2017). Genetic variability and structure of an isolated population of *Ambystoma altamirani*, a mole salamander that lives in the mountains of one of the largest urban areas in the world. *Journal of Genetics*, 96(6), 873-883. <https://doi.org/10.1007/s12041-017-0823-6>
- Heredia-Bobadilla, R. L., Monroy-Vilchis, O., Zarco-González, M. M., Martínez-Gómez, D., Mendoza-Martínez, G. D., Sunny, A., (2016). Genetic structure and diversity in an isolated population of an endemic mole salamander (*Ambystoma rivulare* Taylor, 1940) of central Mexico. *Genética*. 144:689–698.
- Hocking, D., J. & Babbitt, K., J. (2014). Amphibian Contributions to Ecosystem Services. *Herpetological Conservation and Biology*, 9(1):1 – 17.
- IUCN 2022. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2022-2. <https://www.iucnredlist.org>. Consultado el 29 de agosto de 2022.
- Jorde, B. J., Carey, C. J., Bamshad, M. J. (2016). *Genética Médica*. España: Elsevier Health Sciences Spain.
- Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., Palladino, M. A. (2013) *Conceptos de Genética*. Madrid: Pearson Educación
- Koo Michelle, S., Wake, B. (2018). Primer Amphibians. *Current Biology* 28.
- Levy-Gálvez, K. (2017). *Distribución actual de Ambystoma mexicanum y su relación con las variables limnéticas de los canales de Xochimilco*. (Tesis de maestría)]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Li, Y. C., Korol, A. B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*. 11, 2453 – 2465
- Loo, J. A. (2011). *Manual de genética de la conservación: principios aplicados de genética para conservación de la diversidad biológica*. México: SEMARNAT.
- Luikart, G., Allendorf, F. W., Cornuet, J. M., Sherwin, W. B. (1998). *The American Genetic Association*. 89:238–247

- Matías-Ferrer, M. (2006). Diferenciación genética y sistemática de las especies *A. altamirani*, *A. loerae*, *A. rivulare* y *A. zempoalense*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Maya-Pérez, M. (2003). *Estudio histopatológico de algunas enfermedades y lesiones en la colonia de ajolotes (Ambystoma mexicanum) del laboratorio de herpetología de la FES Iztacala*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mena-González, H. & E. Servín-Zamora. 2014. *Manual básico para el cuidado en cautiverio del axolote de Xochimilco (Ambystoma mexicanum)*. Laboratorio de Restauración Ecológica del Instituto de Biología, UNAM. México.
- Millstein, R. L. & Skipper, R. A. (2007). Population Genetics. *The Cambridge Companion to the Philosophy of Biology*. New York: Cambridge University Press Pp. 22-43.
- Monroy Gameliel Omar, Maya. (2006). *Aspectos de mantenimiento y desarrollo en cautiverio del ajolote mexicano (Ambystoma mexicanum)*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Monroy-Vilchis, O., Feredia-Bobadilla, R. L., Zarco-González, M., Ávila-Akerberg, V. & Sunny, A. (2019). Genetic diversity and structure of two endangered mole salamander species of the Trans-Mexican Volcanic Belt. *Herpetozoa*. 32: 237–248.
- NOM-059-SEMARNAT-2010 (2010). Norma Oficial Mexicana. SEMARNAT, Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo, en *Diario Oficial de la Federación*.
- Nunes, A.L., Fill, J. M., Davies, S. J., Louw, M., Rebelo, A. D., Thorp CJ, Vimercati, G., Measey, J. 2019 A global meta-analysis of the ecological impacts

of alien species on native amphibians. *Proceedings of the Royal Society B*: 286: 20182528. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2018.2528>

- Orengo, F. D. (2012). *Fundamentos de Biología Molecular*. Universitat Oberta de Catalunya. Digitalia, <https://www-digitaliapublishing-com.pbidi.unam.mx:2443/a/24469>
- Parra-Olea, G., Flores-Villela, O. & Mendoza-Almeralla, C. (2014). Biodiversidad de anfibios en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 460-466. <https://doi.org/10.7550/rmb.32027>
- Parra-Olea, G., Recuerdo, E., Zamudio, R. (2007). Polymorphic microsatellite markers for Mexican salamanders of the genus *Ambystoma*. *Molecular Ecology Notes*. 7, 818–820
- Parra-Olea, G., Zamudio, K. R., Recuerdo, E., Aguilar-Miguel, X., Huacuz, D. & Zambrano, L. (2012). Conservation genetics of threatened Mexican axolotls (*Ambystoma*). *Animal Conservation*. 15, 61–72.
- Peakall R. and Smouse P. E. 2006 GENALEX 6: genetic analysis in Excel Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288–295.
- Pessier, A., P. (2018). Amphibia. En Karen A. Terio, Denise McAloose, Terio, K. A., McAloose, D. & Leger, S. J. (Ed.), *Pathology of Wildlife and Zoo Animals* (pp. 921-951). Academic Press.
- Pierce, B. A. (2009). *Genética: un enfoque conceptual*. Madrid: Editorial Médica Panamericana
- Ramírez-Bautista, A., Hernández-Salinas, U., García-Vázquez, U., Leyte-Manrique, A. & Canseco-Márquez, L. (2009). Herpetofauna del Valle de México: Diversidad y Conservación. México: UAEH, CONABIO.
- Recuerdo, E., Cruzado-Cortes, E., Parra-Olea, G. & Zamudía, K. R. (2010). Urban aquatic habitats and conservation of highly endangered species: the case of *Ambystoma mexicanum* (Caudata, Ambystomatidae). *Annales Zoologici Fennici*. 47: 223–238.

- Scheele, B. C., Pasmans, F., Skerratt, L. F., Berger, L. R., Martel, A., Beukema, W., Acevedo, A. A., Burrowes, P. A., Carvalho, T., Catenazzi, A., De La Riva, I., Fisher, M. P. A., Flechas, S. V., Foster, C., Frías-Alvarez, P., Garner, T. W. J., Gratwicke, B., Guayasamin, J. M., Conradie, W., Canessa, S. (2019). Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. *Science*, 363(6434), 1459-1463. <https://doi.org/10.1126/science.aav0379>
- SEMARNAT, 2018. *Programa de Acción para la Conservación de las Especies Ambystoma spp*, SEMARNAT/CONANP, México.
- Serna-Lagunes, R. & Díaz-Rivera, P. (2011). Variación genética y conservación de una población de *Crocodylus moreletii* en cautiverio. *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.), 27(3): 547-563
- Souty-Grosset, C., Grandjean, F., Gouin, N. Keynote: Involvement of genetics in knowledge, stock management and conservation of *Austropotamobius pallipes* in Europe. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* 370-371: 165-179
- Sunny, A., Monroy-Vilchis, O., Fajardo, V., Aguilar-Reyes, U. (2014). Genetic diversity and structure of an endemic and critically endangered stream river salamander (Caudata: *Ambystoma leorae*) in Mexico. *Conservation Genetics*. 15:49-59
- Tamarin, R., Cabré, O., & Ruiz, A. (2012). *Principios de genética*. Editorial Reverte. <https://www-digitaliapublishing-com.pbidi.unam.mx:2443/a/67944>
- Uribe-Gracia, A. (2002). *Aislamiento y caracterización de bacterias patógenas de Ambystoma mexicanum*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Van Oosterhout C., Hutchinson W. F., Wills D. P. M. and Ship-ley P. 2004 MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4, 535–538.

- Vargas-Gómez, A. C. (2021). Propuesta De Plan De Manejo De Ajolote *Ambystoma mexicanum* (Amphibia: Caudata: Ambystomatidae) Para El Establecimiento De Un Predio O Instalación De Manejo De Vida Silvestre (Pimvs) En Tepetzotlán (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Villegas-Palma, E. D. (2015). *Comparación de aspectos reproductivos, crecimiento y sobrevivencia de Ambystoma granulosum, Ambystoma lermaense y Ambystoma mexicanum en condiciones de laboratorio.* (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Vizmanos-Pérez, J. L. Claves de la Genética de Poblaciones: Los Mecanismos Genéticos de la Evolución, Elsevier Health Sciences Spain - T, 2014. ProQuest Ebook Central, <http://ebookcentral.proquest.com/lib/unam/detail.action?docID=3429606>.
- Vitt, L. J. & Caldwell, J. P. (2014). Salamanders. *Herpetology*, 457-469. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-386919-7.00016-2>
- Voss, R. S., Woodcock, M. R. & Zambrano, L. (2015). A tale of two axolotls. *Bioscience*. Vol. 65. No, 12
- Wake, D. B. & Vredenburg, V. T. (2008). Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Volumen 1(Suppl 1):11466-73.
- West, J. (2018). Importance of Amphibians: A Synthesis of Their Environmental Functions, Benefits to Humans, and Need for Conservation. In BSU Honors Program Theses and Projects. Item 261. Available at: http://vc.bridgew.edu/honors_proj/261 Copyright © 2018 Josh West
- Witzemberger, K. A., Hochkirch, A. (2011). Ex situ conservation genetics: a review of molecular studies on the genetic consequences of captive breeding programmes for endangered animal species. *Biodiversity Conservation*.