



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

*“Rana montezumae”* en el Jardín  
Botánico de la UNAM.  
Estudios Fenológicos y  
Detección de Enfermedades y  
Malformaciones.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**B I O L O G A**

**P R E S E N T A :**

**PATRICIA DE LOURDES FRÍAS ÁLVAREZ**

**DIRECTOR DE TESIS: DRA. GABRIELA PARRA OLEA**



2005



**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: “Rana montezumae” en el Jardín Botánico de la UNAM. Estudios Fenológicos y Detección de Enfermedades y Malformaciones.

realizado por Patricia de Lourdes Frías Álvarez

con número de cuenta 40004855-0 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
 Propietario

Dra. Gabriela Parra Olea

Propietario

Dr. Gerardo Pérez Ponce de León

Propietario

M. en C. Laura Margarita Márquez Valdelamar

Suplente

Dr. Felipe de Jesús Rodríguez Romero

Suplente

Biol. Edmundo Pérez Ramos

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
 DE BIOLOGÍA

A mis padres: Dr. T. Alejandro Frías Guillot y Ma. de Lourdes Álvarez Craules.

*A mi papá por su fortaleza, por su guía, por su coraje, por su entusiasmo hacia la vida y optimismo, por nunca dejarse vencer y su sabiduría*

*A mi mamá por su apoyo, por su dulzura, por su paciencia, por su voluntad, por su guía, por su ternura.*

A mis Hermanos: Ing. Alejandro G. Frías Álvarez e Ing. Mauricio E. Frías Álvarez.

*Quichi: Por tu ayuda, por tu fuerza, por tu apoyo, por tus consejos y por darme una visión correcta de la vida y por ser tu.*

*Maury: Por tu ayuda, por la alegría, por la enseñanza, por tu apoyo incondicional a todas mis decisiones y por estar ahí.*

A mi abuelo: Ing. Tadeo Frías Ramírez

*Wi: Por acompañarme cada día de mi vida, se que ahora estamos más juntos.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Gabriela Parra Olea tutora de este proyecto. Es un privilegio para México tener una mujer científica y más privilegio para mi el que Gaby sea mi TUTORA. Gracias Gabito por ser mi maestra, por tu paciencia y por enseñarme a amar mi profesión.

A las autoridades y personal del Jardín Botánico por la autorización en la realización de éste estudio y su compañía.

A La M. en C. Laura Marques Valdelmar, por todo su apoyo y enseñanza tanto en el laboratorio como en la vida. Gracias Laura por tu amistad y por la amistad que me otorga tu familia.

A Gerardo Pérez. Por su enseñanza, apoyo y empuje.

A Xochitl Aguilar Miguel por su enseñanza en Histología, por recibirme en su laboratorio con tanta amabilidad y por visión. Al igual que el personal del CIRB

A Mario Paris. Por orientarme en la elaboración del proyecto por su paciencia y por su disposición.

A Erika Marlene Díaz Almeida. Por su paciencia en laboratorio por sus consejos y toda sus enseñanzas.

A Víctor Serrano y Familia. Por su enseñanza estadística y su disposición

A Edmundo Pérez. Por su ayuda y amistad

A Felipe Rodríguez. Por su atención y apoyo

A Luis Antonio Salinas Esquivel, Itzel Torres Díaz, Mónica Flores González por su ayuda en la colecta de tan bellos anfibios.

La identificación de los omicetes fue realizada por la Dra. Guadalupe Vidal del Laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

El estudio helmintológico fue realizado en la Colección Nacional de Helminthos del Instituto de Biología con la colaboración de La Dra. Virginia León y la M. C. Elizabeth Aurelia Martínez Salazar, con el fin de encontrar la posible presencia de una infección por tremátodos. Un agradecimiento especial a la Dr. Virginia León por su aportación de oligonucleótidos para la elaboración de esta tesis.

La identificación taxonómica del género del caracol acuático fue realizada por la Dra. Edna Naranjo de la Colección Nacional de Moluscos del Instituto de Biología de la UNAM.

La identificación de la Garza migratoria encontrada en la REPSA fue realizada por el Biólogo Iván Liebig Fosas del Museo de Zoología de la Facultad de ciencias de la UNAM.

La identificación de la especie de peces fue realizada por el M. en C. Daniel García Bedoya del laboratorio de Restauración Ecológica del Instituto de Biología de la UNAM

Doy una *agradecimiento muy especial* a la siguientes personas, por que sin ellas no lo hubiera podido lograr:

A mi Panino Alfonso y a mi Tía Addy,  
A la familia Pérez Álvarez

A mis amigos de la Universidad

Alejandro Vite Posadas y Yoscelina Centeno Betanzos

*Gracias por acompañarme en las buenas y en las malas, por su sinceridad, respeto, entrega y sobre todo por su amistad.*

Ana Rojas, Carolina Granados, Judith Brena, Erika Lazcano, Luis Hernández, Alex Hunab, Wendoly, Lino, Julio, Lizeth , Laurita, Bosco,

A mis amigos de toda la vida

Maria José, Bere, Mónica, Beto, Jano, Rubén, Claudio, Roberto el Tío, Hugo, Miguel:

*Gracias por más de 10 años de amistad, por los mejores momentos compartidos y su eterna compañía*

A mis hermanos aunque no seamos de la misma sangre

Arturo Vázquez y familia, a mi CuCu Ángeles, Familia Pinilla, Joaquín Ruiz y Familia.

A todos mis compañeros de Laboratorio

Edna, Ruth, Juan Carlos, Anny

Noemí, Lizbeth,

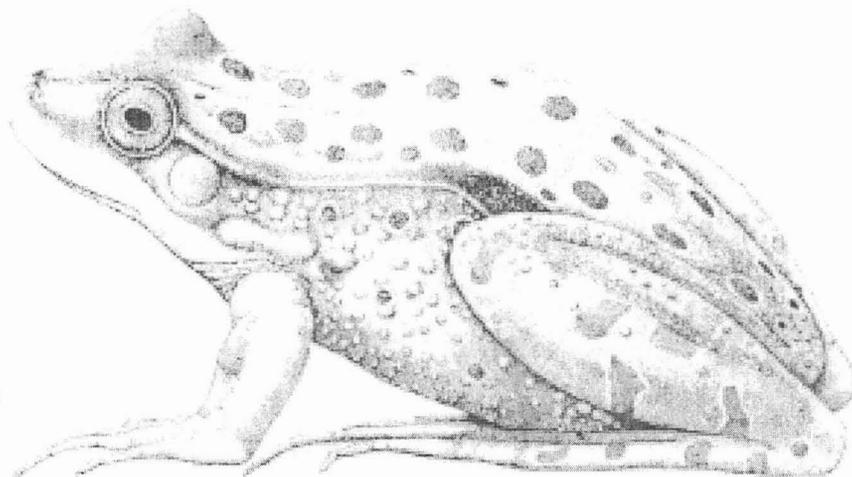
Gracias por el último empujón.

## INDICE

RESUMEN .....	1
Capítulo I Generalidades	
1 Introducción General.....	2
1.1 Especie <i>Rana montezumae</i> .....	3
1.1.1 Taxonomía.....	3
1.1.2 Nombre válido.....	3
1.1.3 Sinonimia .....	3
1.1.4 Nombre común.....	4
1.1.5 Morfología de los adultos .....	4
1.1.6 Morfología de las larvas .....	4
1.1.7 Distribución .....	7
1.1.8 Estado actual de conservación .....	7
1.1.9 Hábitat .....	7
1.1.10 Hábitos .....	7
1.1.11 Importancia .....	7
1.1.12 Depredadores .....	7
1.1.13 Filogenia .....	9
1.1.14 Especies crípticas .....	10
1.2 Área de estudio.....	11
1.2.1 Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel .....	11
1.2.2 Jardín Botánico .....	11
1.3 Descripción general de los Estanques.....	14
1.4 Bibliografía .....	16
Capítulo II Especie del género <i>Rana</i> en los estanques del Jardín Botánico de la UNAM	
2.1 Introducción .....	18
2.1.1 DNA ribosomal .....	18
2.2 Objetivos .....	19
2.3 Material y Método .....	19
2.3.1 Trabajo de campo .....	19
2.3.2 Trabajo de laboratorio .....	20
2.3.3 Extracción de DNA .....	20
2.3.4 Amplificación por PCR .....	21
2.3.5 Purificación de PCR .....	22
2.3.6 Secuenciación .....	22
2.3.7 Análisis Filogenético .....	23

2.4 Resultados .....	23
2.5 Discusión y Conclusiones.....	24
2.6 Bibliografía .....	27
 Capítulo III Fenología Reproductora y Plasticidad Fenotípica de <i>Rana montezumae</i> en el Jardín Botánico de la UNAM.	
3.1 Introducción .....	28
3.2 Objetivos .....	29
3.3 Material y Método .....	29
3.4 Resultados .....	30
3.4.1 Resultados globales .....	30
3.4.2 Fenología reproductora .....	31
3.4.3 Plasticidad Fenotípica .....	34
3.5 Discusión y Conclusiones .....	37
3.6 Bibliografía .....	39
 Capítulo IV Enfermedades y malformaciones de <i>Rana montezumae</i> en el Jardín Botánico de la UNAM	
4.1 Introducción .....	40
4.1.1 Quitridiomycosis .....	41
4.1.2 Saprolegniosis .....	45
4.1.3 Deformaciones .....	47
4.2 Objetivo .....	48
4.3 Materiales y Método .....	48
4.3.1 Trabajo de campo .....	48
4.3.1.1 Características de la zona .....	48
4.3.1.2 Colecta de especímenes .....	50
4.3.2 Trabajo de laboratorio .....	50
4.3.2.1 Histología .....	50
4.3.2.2 Identificación del moho acuático.....	50
4.3.2.3 Disección .....	50
4.4 Resultados .....	51
4.4.1 Resultados globales .....	51
4.4.2 Resultados por estanques .....	51

4.4.3 Quitridiomycosis: estudio histológico .....	54
4.4.4 Identificación de mohos acuáticos.....	54
4.4.5 Examen helmintológico .....	56
4.5 Discusión .....	56
4.5.1 Quitridiomycosis .....	56
4.5.2 Saprolegniosis.....	57
4.5.3 Deformaciones .....	58
4.6 Bibliografía .....	62
Apéndice 1 .....	66
Apéndice 2 .....	67
Apéndice 3 .....	68



*Rana montezumae*. Tomado de Uribe *et al.* (1999)

## RESUMEN

En este trabajo se describe la fenología reproductora y la plasticidad en el desarrollo y crecimiento larval de *Rana montezumae* en los estanques del Jardín Botánico de la UNAM, así como también se presentan detalles sobre las enfermedades y malformaciones de la población de este anfibio. El Jardín Botánico de la UNAM, presenta 13 estanques artificiales que permiten el establecimiento de una población de *Rana montezumae*. En cinco de ellos está rana lleva a cabo su desarrollo completo, siendo los otros estanques visitados esporádicamente por formas adultas. Después de mostrar un capítulo introductorio, los resultados del presente trabajo se presentan en tres capítulos independientes. En el primero de ellos se aborda la delimitación de la especie de rana encontrada en el área de estudio. Para ello se utilizó el gen ribosomal 12S y se determinó que la única especie que habita en los estanques es *Rana montezumae*. Una vez establecido que la especie en cuestión es *Rana montezumae* en el capítulo III se estudia la fenología reproductora de la población y la plasticidad en el desarrollo y crecimiento de larvas. Se encontró que la relación entre el crecimiento y diferenciación es variable entre los diferentes estanques estudiados. Los renacuajos que se encontraron en un sitio de crianza con una estabilidad alta, realizaron la metamorfosis a mayor tamaño que aquellos renacuajos que se encontraron en sitios de crianza con una estabilidad media y baja. Estas variaciones pueden ser interpretadas como una estrategia en el desarrollo para la sobrevivencia de la rana en ambientes heterogéneos. En el último capítulo se describen algunas de las enfermedades que afectan a la población de *Rana montezumae* en los estanques del Jardín Botánico de la UNAM, así como también se presentan evidencias de malformaciones en dicha población. En larvas de *Rana montezumae* se encontró la sintomatología típica de la quitridiomycosis, enfermedad causada por el hongo quitridial *Batrachochytrium dendrobatidis*. Así mismo se encontró una masa blanca algodonosa identificada como *Saprolegnia* sp en una larva viva, en un metamórfo muerto y en un adulto muerto y *Saprolegnia ferax* en un metamórfo hallado muerto. Por último se halló una larva con extremidad supernumeraria cuya causa puede atribuirse a la presencia del trematodo del género *Ribeiroia*, sin embargo el agente etiológico no fue encontrado. Este trabajo aporta datos sobre la biología y ecología de la población de *Rana montezumae* en una región particular de la República Mexicana.

## 1 INTRODUCCIÓN GENERAL

La diversidad de anfibios a nivel mundial está formada por un total de 5763 especies de las cuales 5059 son anuros, 534 son urodelos y 170 cecilidos (AmphibiaWeb, 2005). El orden Anura posee 29 familias, entre las que se encuentra la familia Ranidae que actualmente reconoce 11 subfamilias, 53 géneros y 732 especies (AmphibiaWeb, 2005). Dentro de la familia Ranidae el género *Rana* es el tercer grupo taxonómico con mayor riqueza específica, al estar constituido por 233 especies (AmphibiaWeb, 2005).

Los individuos de la familia Ranidae son conocidos como “ranas verdaderas” (AmphibiaWeb 2005), se encuentran alrededor del mundo con la excepción de América del sur, el oeste de India, la región Australiana y la mayoría de las islas de Oceanía (Duellman y Trueb 1994). Los intervalos en la longitud de su cuerpo van de 5 a 40 cm, la pupila es usualmente horizontal, los machos generalmente tienen sacos bucales laterales pareados, el número de vértebras presacrales es ocho, no tienen costillas, en la mayoría de los casos las maxilas tienen dientes (Hofrichter *et al.* 2000), y por último, no poseen cartílago intercalar entre las penúltimas y últimas falanges (AmphibiaWeb 2005).

Los integrantes de la familia Ranidae son específicos a sus sitios de crianza, regresan cada año al mismo sitio de anidación (Hofrichter *et al.* 2000). Los amplexos tienden a ser axilares (Hofrichter *et al.* 2000), la mayoría de las especies depositan en forma de masa globosa pequeños huevos pigmentados, generalmente en aguas con poco movimiento (Duellman y Trueb. 1994), tienen larvas libres nadadoras, aunque en algunas especies asiáticas el desarrollo es directo como *Ceratobatrachus*, *Discodeles*, *Palmatorappia* y *Platymantis* (Duellman y Trueb 1994; Hofrichter *et al.* 2000).

En México existen 290 especies de anfibios, de las cuales 195 son anuros, 93 urodelos y 2 cecilidos (Flores-Villela 1991; 1993b). El orden Anura tiene un total de nueve familias y 26 géneros, representando así el 5.5% de la fauna de anfibios a nivel mundial (Flores-Villela 1993b). El único género de la familia *Ranidae* que se encuentra en México *Rana* (Flores-Villela 1993b), el cual cuenta con 24 especies, de las cuales 13 son endémicas (Flores-Villela y Gerez. 1994). En el Distrito Federal se han reportado dos especies del género *Rana* endémicas del país: *Rana tlaloci* y *Rana montezumae* (Flores-Villela y Gerez 1994).

El presente estudio, realizado en el Jardín Botánico de la UNAM, documenta la fenología reproductora y la plasticidad en el desarrollo larval, así como la detección de enfermedades así como malformaciones encontradas en *Rana montezumae*.

## 1.1 Especie

*Rana montezumae* Baird (1854)

### 1.1.1 Taxonomía

Reino:	Animalia
Subreino:	Metazoa
Phylum:	Chordata
Subphylum:	Vertebrata
Superclase:	Tetrapoda
Clase:	Amphibia
Orden:	Anura
Suborden:	Diplasiocoela
Familia:	Ranidae
Genero:	<i>Rana</i>
Especie:	<i>montezumae</i>

### 1.1.2 Nombre válido

*Rana montezumae*: Baird, 1854. Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia vol.7, p.61; Report on the U.S. and Mexican boundary Survey, vol. 2, Reptiles 1859, p.27, pl.36, fig 1-6. Kellog, U.S. Nat Mus. Bull. 160, 1932, pp.191-192, 197, 199. Taylor, Univ. Kansas Sci. Bull., vol 28, 1942, pp, 46-47, pl. 3, fig 1-5 (renacuajo).

### 1.1.3 Sinonimia

*Rana adrita* Troschel, in Mueller, Reisen in den Vereinigten Staaten, Canadá and México, vol 3, 1865, p. 616 ( México; tipos desconocidos).

*Rana mexicana*

*Rana moctezuma*

*Rana montezuma*

*Rana montezumae*

*Rana montezumae concolor* Cope. 1887, U.S. Nat Mus. Bull. 32, p.20 (Guanajuato; lectotipo U.S.N.M. No. 81101).

*Rana montezumae montezumae*, Baird, 1854, Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia, 7: 61; Cope, 1887, Bull. U.S. Natl. Mus., 32: 20

*Rana pipiens montezumae*

*Rana (Pantherana) montezumae*, Dubois, 1992, Bull. Mens. Soc. Linn. Lyon, 61: 332.

*Raneus montezumae*

#### 1.1.4 Nombre común

Se le conoce comúnmente como rana negra o rana verde (Rudich de la Rosa 1980).

#### 1.1.5 Morfología de los adultos

La morfología de *Rana montezumae* la describen Uribe *et al.* (1999). Organismos de tamaño mediano, con LHC  $x = 57.1 \pm 7.1$  mm (41.0-96 mm, n=16); las hembras son más grandes ( $x = 69.3 \pm 8.7$  mm) que los machos (= 50.3 mm); el color de fondo generalmente es café o gris, punteado de blanco. Cabeza ancha de tal manera que la amplitud que hay a nivel del ángulo de las mandíbulas es más grande que la distancia entre la punta del hocico y el margen posterior del tímpano; el hocico es redondeado; no se distingue el canto rostral, la región loreal es ligeramente cóncava, los nostrilos son notables y están situados en un punto equidistante entre los ojos y el hocico, los ojos son grandes y sobresalen; el tímpano se aprecia claramente y su tamaño es dos tercios del diámetro del ojo, los dientes vomerianos se disponen transversa y oblicuamente en pequeños grupos situados detrás de los bordes posteriores de las coanas. Las glándulas del costado son estrechas y prominentes, extendiéndose de la parte superior del tímpano a la región sacra; entre ellas sobre todo en la parte posterior, se presentan pequeñas verrugas; los lados tienen tubérculos de tamaño uniforme. Las extremidades posteriores son largas y los dedos terminan en punta, y presentan una membrana interdigital que cubre hasta la punta de los dedos de los pies. Cuando se lleva el talón hacia delante éste alcanza el tímpano o un poco más adelante; los tubérculos subarticulares son pequeños; pliegue dorsolateral poco prominente; el tubérculo metatarsal interno es sobresaliente; su forma es elíptica o casi triangular, con tubérculos metatarsales externos. La región dorsal generalmente es de color castaño punteado de blanco, los puntos son diminutos en la parte dorsal, pero en la parte lateral del cuerpo y de los muslos se tornan más grandes, siendo en ocasiones verdaderas manchas. El vientre es amarillo claro jaspeado de gris, sobre todo en la región gular y extremidades (Fig.1)

#### 1.1.6 Morfología de las larvas

Las larvas son grandes y robustas, la cabeza es mucho más estrecha que el cuerpo; ojos dorso laterales no visibles desde el fuelle, la distancia entre ellos ligeramente más grande que la distancia a la punta del hocico, los nostrilos casi equidistantes entre los ojos y la punta del hocico, cercano uno con el otro, la distancia entre ellos menos que la distancia de cada ojo o punta del hocico, espiráculo lateral sinistral, esta distancia al ojo es un poco más grande que entre la distancia entre ojos, la apertura anal es destal (Taylor 1942). La longitud relativa del cuerpo y de la cola no parece variar con el creciente tamaño (Korky y Webb 1992). La cola es más larga que el cuerpo (Korky y Webb 1992). La forma del cuerpo en vista dorsal es un triángulo tipo roma o un triángulo achatado anteriormente con un ligero mellado posterior a los ojos que tiende a separar la cabeza del abdomen en el término anterior de los músculos dorso laterales; esta separación es obvia en la vista lateral,

especialmente en las larvas grandes (Korky y Webb 1992). La musculatura proximal de la cola es gruesa y robusta (Korky y Webb 1992). La musculatura de la cola con segmentos bien definidos, empieza en el centro de la espalda, la aleta dorsal empieza en la mitad de la espalda, algo baja al principio, después va creciendo hasta alcanzar la altura máxima al empezar la tercera mitad de la cola, la aleta dorsal es más ancha en la parte estrecha que en la parte musculosa de la cola, pero más ancha que en la parte ventral (Taylor 1942). Fig. 1.1.

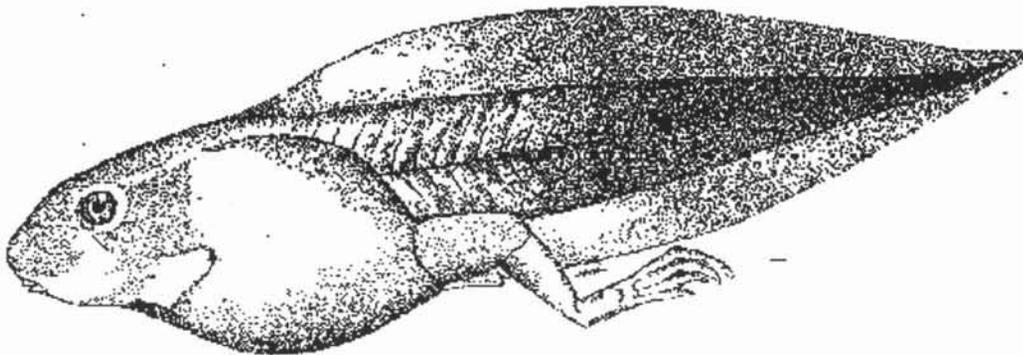


FIG.1.1. Ilustración de la larva de *Rana montezumae*. Tomada de Taylor (1942).

*Coloración y patrones.* - Los renacuajos vivos muestran una considerable variación en los colores y los patrones entre las mismas especies debido a la ontogenia y las variables ambientales (Korky y Webb 1992). Al preservar los renacuajos en formol, pierden su color debido a la filtración, pero retiene patrones de melanina en varios grados (Korky y Webb 1992). Los renacuajos en formol muestran una variación en la retención de la melanina, dependiendo del tamaño (Korky y Webb 1992). Los renacuajos pequeños tienden a ser claros, con la cola lisa (sin dibujos), con una reducida cantidad de melanina en el cuerpo y en la musculatura de la cola y poseen líneas tenues en el cuerpo y miómeros en la cola (Taylor 1942). Dorsalmente de verde oliva, el color continua a los lados de la región de la cabeza y abdomen, negro a los lados, barbilla verdusca o rojo amarillenta; intestino visible a través de la pared abdominal, los músculos de la cola y aletas bastantes verde amarillentas, en la base empieza hacerse negro; posteriormente con algunos puntos (Taylor 1942). Las características de color y patrones están mejor desarrolladas en los renacuajos grandes los cuales tienen el dorso de su cuerpo y los lados gris oscuro con miómeros distintivos en el contorno dorsolateral; el vientre es generalmente claro o ligeramente gris con el intestino visible (Taylor 1942). La musculatura amarilla clara de la cola tiene distinciones, mayormente sin dibujos, miómeros anteriores, con un fino jaspeado de puntos coalescentes y motas posteriores (Korky y Webb 1992). En los renacuajos recién fijados la cola es de color verde negrusco, pero falta el color en algunos de los renacuajos con tiempo de fijado (Taylor 1942). En el momento en que aparecen los miembros la cola sigue siendo tan larga como la cabeza y el cuerpo (Taylor 1942).

*Disco oral.*- Las papilas con o sin pigmentar son pequeñas y escasas dentro de la curva o comisura de la boca (Korky y Webb 1992). En los lados de la boca y en labio inferior se encuentran flecos libres de amplitud variable varios anchos, estos a su vez están limitados por una sola fila de papilas; algunas papilas adicionales próximas a la curva o comisura de la boca (Taylor 1942). Korky y Webb (1992) describen la fórmula de la fila de los dientes que es aplicable a la mayoría de las larvas 2(2)/3(1). La longitud de las filas de dientes de A-1 es más o menos la misma longitud del ancho de la boca. La fila de dientes A-2 es variable. La hilera de dientes de la derecha y la hilera de dientes de la izquierda están separadas por un espacio grande (más grande que cada hilera de dientes). Las filas de dientes A-2 pueden ser variables, pueden estar presentes las dos, puede estar presente solo un lado ya sea izquierdo o derecho, o pueden no estar. La variación que se indica parece que no tiene que ver con el estado de desarrollo. La hilera de dientes P1 tiene un estrecho espacio medio. La tercera fila de dientes, la más inferior, es notablemente más corta que la P-1 o P-2 más o menos de la misma longitud. Fig.1.2.

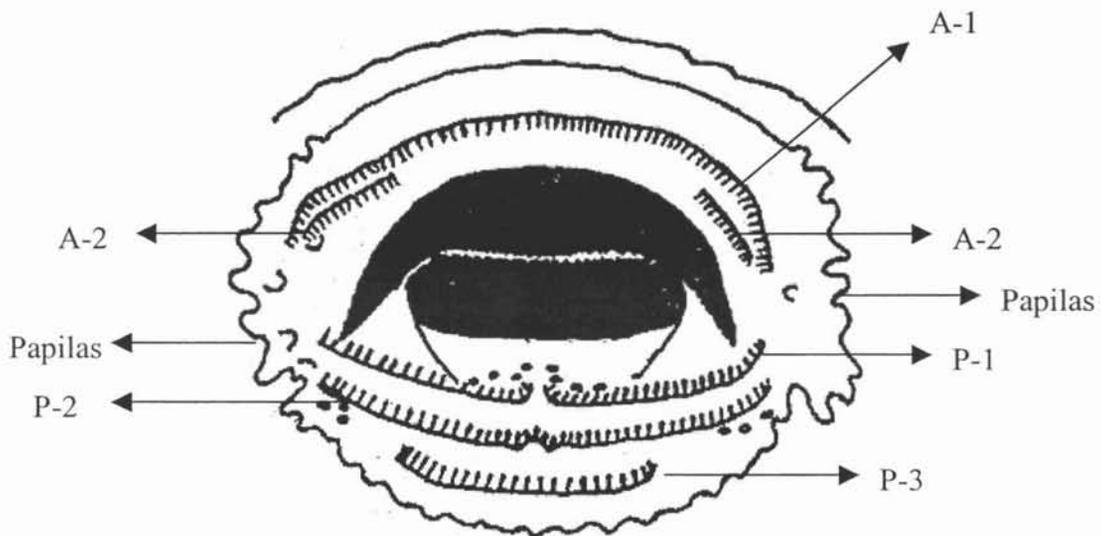


FIG 1.2. Dibujo del disco oral de la larva de *Rana montezumae*, estado de desarrollo según Gosner 34. Tomado de Korky y Webb. (1992).

Korky y Webb (1992) sugieren la siguiente combinación de características de *Rana montezumae* como una posible utilidad en la comparación con las larvas del complejo de *Rana pipens*:

1. La relativa pigmentación posterior de marcas negras y abundantes en la cola.
2. Fila de dientes A-3 nunca presentes.
3. Un espacio ancho de A-2 (más ancho que cada segmento de filas laterales).
4. Ausencia ocasional de la fila A-2.
5. Una relativa longitud corta de la fila P-3 en comparación con P-2

### **1.1.7 Distribución**

*Rana montezumae* es una especie endémica de México, se ha registrado en los estados de Aguascalientes, Distrito Federal, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Zacatecas (Flores-Villela y Gerez. 1994) (Fig.1.3.). Se tienen datos dudosos o presencia no confirmada en el Estado de Morelos (Flores-Villela y Gerez 1994).

### **1.1.8 Estado actual de conservación**

Ante el status de conservación de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) *Rana montezumae* no aparece en ninguna categoría de riesgo. Tampoco se encuentra dentro del apéndice I y II de la “Convention on International Trade in Endangered Species of Wild fauna and Flora”(CITES). Sin embargo está especie esta registrada como sujeta a protección especial por la norma ecológica oficial mexicana NOM-059-ECO 2001.

### **1.1.9 Hábitat**

*Rana montezumae* se encuentra en bosques de *Quercus* o Encino, bosques espinosos, matorral xerófilo, y en ambientes acuáticos (Flores-Villela y Gerez 1994). Se localizan frecuentemente en zonas alteradas (Uribe *et al.* 1999). Reportada a una altitud mínima de 1,500 m.s.n.m y una altitud máxima de 2,000 m.s.n.m (Flores-Villela y Gerez 1994). Es particularmente interesante que para el presente trabajo se encontró una población a una altitud de 2,250 m.s.n.m.

### **1.1.10 Hábitos**

*Rana montezumae* es una especie de actividad nocturna; sin embargo, se le puede encontrar durante el día, en las primeras horas de este (Uribe *et al.* 1980). El alimento que ingiere con más frecuencia son insectos de los ordenes Hemiptera, Orthoptera, Hymenoptera, y Diptera (larvas y adultos), así como crustáceos, anélidos y arácnidos (Uribe *et al.* 1999).

### **1.1.11 Importancia**

*Rana montezumae* es una especie comestible, se sabe que en el lago de Tecocomulco es utilizada como alimento, donde las ancas son comúnmente consumidas (obs. pers).

### **1.1.12 Depredadores**

Mamíferos, aves acuáticas, algunos peces (Rudich de la Rosa 1980). En el presente estudio se observó a la garza *Butorides virescens* como consumidora habitual de *Rana montezumae*.



FIG1.3. Mapa de distribución de *Rana montezumae* en México.

### 1.1.13 Filogenia

El subgrupo *montezumae* consiste de cinco especies descritas y una sin describir: *R. dunni*, *R. montezumae*, *R. megapoda*, *R. chiricahuensis*, *R. subaquavocalis* de la planicie mexicana (Hillis y Wilcox 2005), (Fig.1.4.).

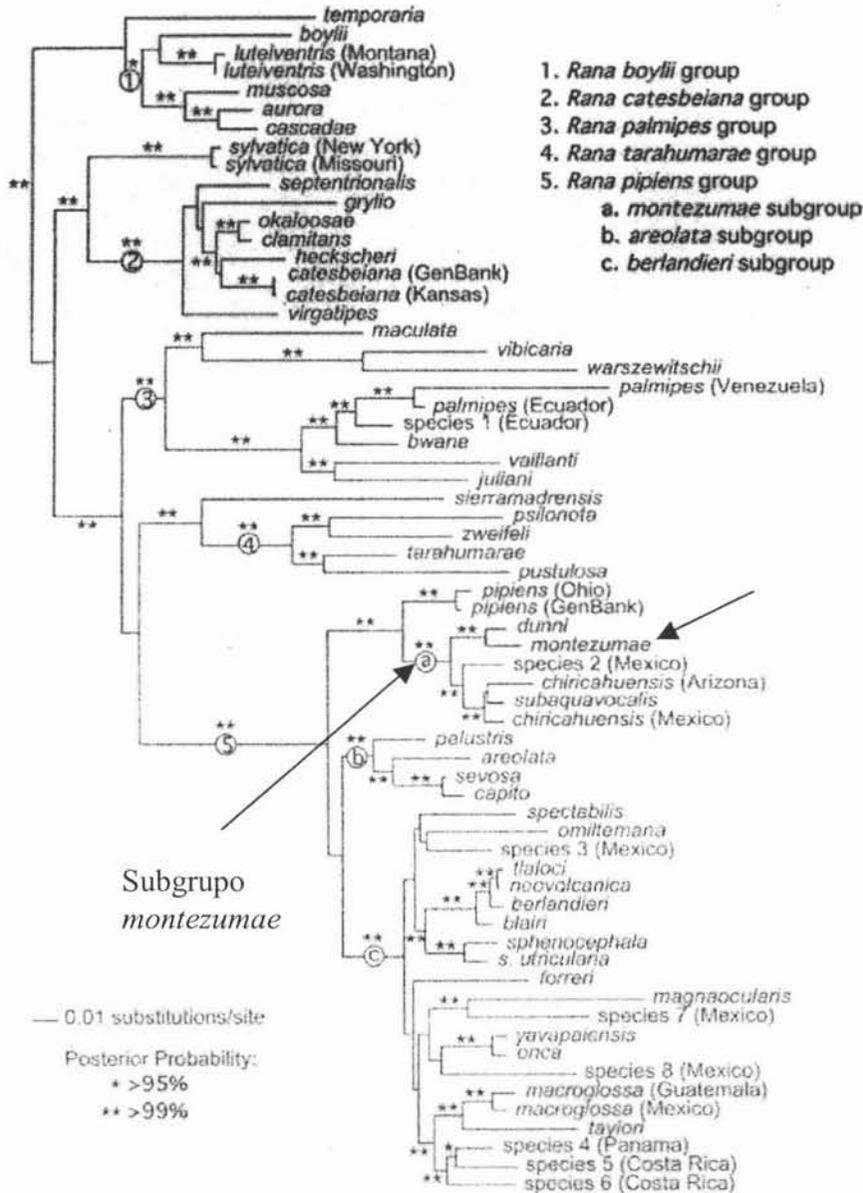


FIG 1.4. Árbol filogenético del género *Rana* en América. Tomado de Hillis y Wilcox (2005). Se señala con una flecha al Grupo *montezumae* y en particular *Rana montezumae*.

### 1.1.14 Especies crílicas

El género *Rana* esta caracterizado por poseer una remarcada y conservada morfología externa, razón por la cual ha sido históricamente difícil de delimitar (Zaldivar *et al.* 2004). Es posible la confusión de metamórficos de *R. montezumae* con *R. spectabilis* y *R. tlaloci*; los caracteres que probablemente los distinguen en etapa adulta son el tipo de pliegues dorsolaterales, forma de la cabeza, longitud de las piernas y color dorsal (Tabla. 1.1.).

TABLA.1.1. Caracteres útiles para diferenciar a *R. montezumae* de *R. tlaloci* y *R. spectabilis*

ESPECIE	CARACTER	DESCRIPCIÓN
<i>R. montezumae</i>	Pliegue dorsolateral	Poco prominente. (Uribe et al. 1999)
<i>R. spectabilis</i>	Pliegue dorsolateral	Alisados, anchos y usualmente de color bronce. (Hillis y Frost 1985)
<i>R. tlaloci</i>	Pliegue dorsolateral	Prominentes, levantados y de color bronce. (Hillis y Frost 1985)
<i>R. montezumae</i>	Forma de la cabeza	Ancha de tal manera que la amplitud que hay a nivel del ángulo de las mandíbulas es más grande que la distancia entre la punta del hocico y margen posterior del timpano. El hocico es redondeado. (Uribe et al. 1999)
<i>R. spectabilis</i>	Forma de la cabeza	Corta y redondeada. (Hillis y Frost. 1985)
<i>R. montezumae</i>	Longitud de las piernas	Cuando se lleva la tibiofibula hacia delante éste alcanza el tímpano. (Uribe et al. 1999)
<i>R. spectabilis</i>	Longitud de las piernas	Cortas, la distancia final de la tibiofibula no alcanza la boca. (Hillis y Frost 1985)
<i>R. tlaloci</i>	Longitud de las piernas	Piernas relativamente largas, el final de la tibiofibula extendida, más allá del hocico cuando esta se presiona a lo largo del cuerpo. (Hillis y Frost 1985)
<i>R. montezumae</i>	Color dorsal	Castaño, punteado de blanco. (Uribe et al. 1999)
<i>R. spectabilis</i>	Color dorsal	Verde metálico a amarillo verdoso. (Hillis y Frost. 1985)
<i>R. tlaloci</i>	Color dorsal	Café oscuro con ligeros halos alrededor de las manchas dorsales. (Hillis y Frost 1985)
<i>R. montezumae</i>	Patrón dorsal de manchas	Pequeños, redondeados, oscuros y numerosos. (Pérez –Ramos com. pers)
<i>R. spectabilis</i>	Patrón dorsal de manchas	Medianas, ovaladas, de color café, con bordes claros. (Pérez –Ramos com. pers)
<i>R. tlaloci</i>	Patrón dorsal de manchas	Medianas, cuadrilongas, color café, con bordes claros (Pérez –Ramos com. pers)
<i>R. montezumae</i>	Membrana interdigital	Amplia hasta la parte distal del dedo (Pérez –Ramos com. pers)
<i>R. spectabilis</i>	Membrana interdigital	Escasa (Pérez –Ramos com. pers)
<i>R. tlaloci</i>	Membrana interdigital	Escasa (Pérez –Ramos com. pers)
<i>R. montezumae</i>	Forma de la punta de los dedos	Ancha (Pérez –Ramos com. pers)
<i>R. spectabilis</i>	Forma de la punta de los dedos	Roma (Pérez –Ramos com. pers)
<i>R. tlaloci</i>	Forma de la punta de los dedos	Roma (Pérez –Ramos com. pers)

## 1.2 Área de estudio.

### 1.2.1 Reserva del Pedregal de San Ángel

El Pedregal de San Ángel se encuentra en la Ciudad de México (19° 17' N, 99° 1' W) dentro del campus de la Universidad Nacional Autónoma de México, a una altitud de 2300 m.s.n.m (Camacho 1999). Se formó a partir de la erupción del volcán Xitle y conos adyacentes, su edad fluctúa, alrededor de los 2500 años (Álvarez *et al.* 1982); antiguamente el derrame original se encontraba desde las faldas del Ajusco hasta lo que hoy conocemos como avenida Miguel Ángel de Quevedo, abarcando 80 Km<sup>2</sup> (Rojo 1994). Debido al crecimiento urbano la zona del malpaís se ha reducido en un 90%, quedando solo fragmentos aislados del ecosistema natural (Rojo 1994). Dentro de la Universidad Nacional Autónoma de México se encuentra uno de los ejemplos de estos fragmentos, convirtiéndose así en un refugio para muchas especies (Fig.1.5).

La reserva Ecológica del Pedregal (REPSA), posee un clima templado y sin estación fría pronunciada, propia de las planicies altas de regiones tropicales y subtropicales (Rzedowski 1954). Su temperatura media anual es de 15.5° C, con variaciones extremas que van desde los -6° C hasta los 34.6° C (Valiente-Banuet y De Luna 1990). La precipitación media anual oscila entre los 700 y 950 mm (Herrera y Almeida 1994). La vegetación es considerada como un Matorral Xerófilo constituido predominantemente por un estrato herbáceo bien desarrollado, un arbustivo ligeramente menos importante y pocos elementos arbóreos (Rzedowski 1954; Valiente-Banuet y De Luna 1990); se observa una temporalidad marcada de sequía (noviembre a mayo) y otra de lluvias (junio a octubre) (Rzedowski 1954). La reserva ecológica está integrada por dos zonas: la zona núcleo y la zona de amortiguamiento: La zona núcleo comprende 115 ha, y 751 metros<sup>2</sup>, es la zona de la Reserva destinada exclusivamente a las tareas de investigación y de docencia (Rojo 1994). La zona de amortiguamiento ocupa 31 hectáreas, 8,151 m<sup>2</sup>, tiene como finalidad principal, moderar de manera natural los efectos negativos ocasionados por la presencia de las instalaciones existentes dentro de la zona de la reserva (Rojo 1994).

### 1.2.2 Jardín Botánico

El Jardín Botánico está ubicado en el circuito exterior de la Ciudad Universitaria; siendo parte de la zona de amortiguamiento de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, a una altitud de 2,250 m.s.n.m, con una temperatura máxima de 35°C y una temperatura mínima de -5 ° C, la precipitación media anual es de 840 mm. Cuenta con una área total de 4 ha (Hernández *et al.* 1990). Las características del Jardín Botánico conforman un paisaje único dentro del Valle de México. Las colecciones están constituidas por las siguientes zonas: Zona árida, templada, cálido-húmeda, de plantas útiles y la Zona de Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (Fig.1.6). A su vez cada zona se divide en secciones, de acuerdo a criterios taxonómicos, geográficos, ecológicos, culturales, entre otros (Hernández 1990). Algunas zonas poseen estanques que son utilizados con fines decorativos, pero estos sistemas acuáticos son el hábitat de diversos animales como insectos, moluscos, peces, anfibios, reptiles y aves. El Jardín Botánico cuenta con 13 estanques localizados a lo largo de las zonas. En este trabajo se estudiaron 3 estanques de diferentes zonas del Jardín Botánico dada la presencia de alguna especie de *Rana*.

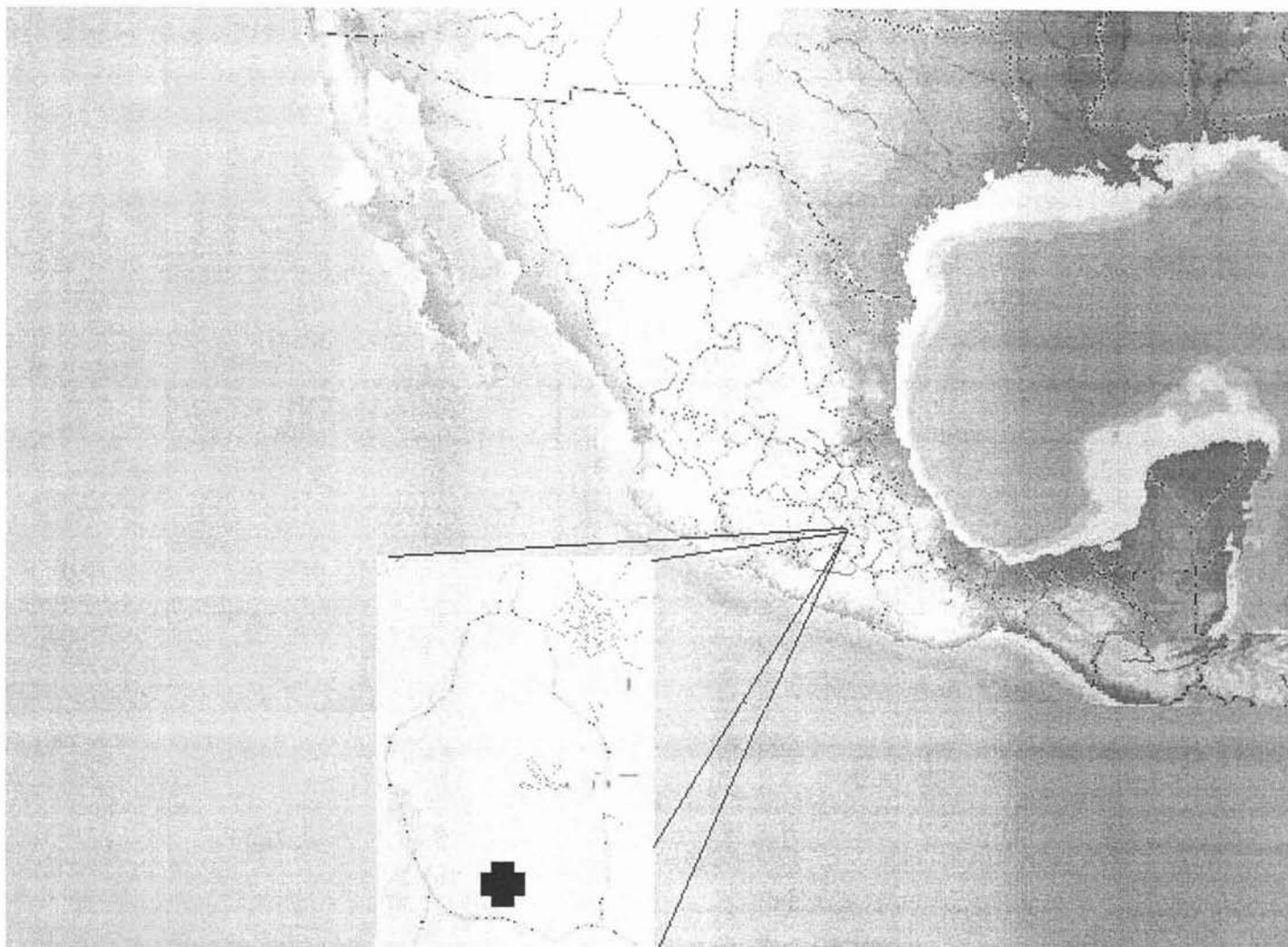


FIG 1.5. Mapa de México, donde se muestra el Distrito Federal. La Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (marcado con una cruz). El lugar donde se realizó el estudio se encuentra al sur del Valle de México



FIG1.6. Mapa del Jardín Botánico de la REPSA, donde se muestran sus colecciones organizadas por zonas. Los estanques estudiados se encuentran en diferentes lugares de las zonas. Estanque #1 (marcado con una estrella) se encuentra en la zonas de Plantas útiles, Estanque # 2 (marcado con una cruz) se encuentra en la zona cálido-húmeda , Estanque # 3 (marcado con una flecha) se encuentra en la zona árida.

Los estanques estudiados están en las siguientes zonas: Plantas útiles (Estanque #1), Zona cálido-húmeda (Estanque #2), Zona árida (Estanque #3), (Fig.1.6.).

Durante 14 meses se tomaron notas de campo del estado general de los estanques estudiados. Cada vez que se realizaban los muestreos, se consideraron los siguientes datos: temperatura, profundidad, limpieza de basura, mantenimiento, bombeo de agua y biota existente. La medición de la temperatura se tomó en el mismo sitio cada vez que se realizaba el muestreo. La profundidad se tomó en el mismo sitio todas las ocasiones que se realizaba el trabajo por medio de un madero y flexómetro. A continuación se describen las características de cada estanque:

## **DESCRIPCIÓN GENERAL DE LOS ESTANQUES**

### **Estanque #1**

Charca con una temperatura media anual de 14.2° C y profundidad media anual de 59 cm. Estanque con flujo de agua tipo cascada que da movimiento continuo al líquido, la bomba es conectada todos los días de 7:00 de la mañana a 3:00 de la tarde. Estanque artificial de roca volcánica recubierta por cemento. El sustrato es de sedimento con hojarasca. Posee algas filamentosas (*Spirogyra* sp.) y plantas acuáticas (*Nymphaea* sp.). La biota esta representada por insectos, caracoles del género *Planorbella*, peces (*Carassius auratus*), *Rana montezumae*, tortugas de los géneros *Kinosternon* sp. y *Trachemys* sp. En los meses de octubre a febrero es común observar el ave migratoria *Butorides virescens*. Existen varios refugios para la biota en el lugar. Cuenta con mantenimiento constante el cual consiste en limpieza superficial de basura y hojarasca y la extracción del alga filamentosas, no se ha vaciado para limpieza en más de dos años. Nota: Es habitual encontrar monedas en su interior y en varias ocasiones se sacaron pilas oxidadas del fondo del estanque.

### **Estanque #2**

Charca con temperatura media anual de 15.9° C. y profundidad media anual de 25.05 cm. Estanque con suministro de agua permanente. El suministro de agua en ocasiones esta en funcionamiento por lo tanto no hay movimiento continuo de agua. Estanque artificial de cemento con sustrato de tierra y hojarasca. Posee plantas acuáticas (*Nymphaea* sp) y al centro del estanque *Equicetum* sp. Su biota esta compuesta por insectos, caracoles del género *Planorbella* sp, *Rana montezumae*. Es común observar a la garza verde *Butorides virescens*. No posee refugios para la biota. No cuenta con mantenimiento constante de basura y hojarasca. En algún momento del año es vaciado con todos los organismos acuáticos y se vuelve suministrar con agua quedando solo los organismos que resistieron el proceso de limpieza.

### **Estanque #3**

Charca con temperatura media anual de 14.69° C y profundidad media anual de 60 cm. Estanque con cascada. La cascada en muy pocas ocasiones está en funcionamiento por lo que no posee movimiento de agua. Estanque artificial de roca volcánica recubierto por cemento. El sustrato es de sedimento. Posee algas filamentosas (*Spirogyra* sp) y plantas acuáticas (*Nymphaea* sp). Su biota esta compuesta por insectos, caracoles del género *Planorbella*, *Rana montezumae*, tortugas del género *Kinosternon* sp. La garza verde *Butorides virescens* ave migratoria está presente de octubre a febrero. Existen muchos refugios de piedra volcánica. No cuenta con mantenimiento constante de basura y

hojarasca. El alga filamentosa no es retirada durante mucho tiempo hasta que se realiza una limpieza del lugar que consiste en tallar todas las paredes del estanque con productos químicos (detergente y cloro) se vuelve a suministrar con agua y solo quedan los organismos que resistieron el proceso. Nota: En ocasiones se encontraron pilas en el interior del estanque.

## 1.4 BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez J, J, Carabias, J, Meave, C.P., Moreno, D, Nava, F, Rodríguez , C, Tovar, A, Valiente-Banuet. (1982). Proyecto para la creación de una Reserva en el Pedregal de San Ángel. Cuadernos de Ecología No.1 Fac. de Ciencias. UNAM.
- AmphibiaWeb: Information on amphinian biology and conservation (web application). 2005. Berkeley, California: AmphibiaWeb. Available: <http://amphibiaweb.org/>. (Accessed: 2005).
- Camacho C.E. (1999). Demografía y movilidad de *Sphenarium purpurascens* (Orthoptera: Pyrgomorphidae) en la reserva del pedregal de San Ángel, DF. (México). Tesis Prof. De Biología. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Duellman W.E., y L Trueb. (1994). Biology of Amphibians. The Johns Hopkins University Press. 670 pp.
- Flores-Villela O. (1991). Análisis de la distribución de la herpetofauna en México. Tesis doctorado, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 269 pp.
- Flores-Villela O. (1993). Herpetofauna Mexicana. Lista anotada de las especies de anfibios y reptiles de México, cambios taxonómicos recientes y nuevas especies *Carnegie Museum of Natural History. Special Publication* No 1. 22 pp.
- Flores-Villela O. (1993b). Riqueza de los anfibios y reptiles. *Ciencias*. No especia **17**,33-42.
- Flores-Villela O, y P. Gerez. (1994). Biodiversidad y conservación en México, vertebrados, vegetación y uso del suelo. Comisión Nacional para el conocimiento de la biodiversidad & Universidad Nacional Autónoma de México.439 pp.
- Hernández Z, A, Terrazas, M, Linares. (1990). Las colecciones del Jardín Botánico del Instituto de Biología. México. DF. UNAM. 33 pp.
- Herrera A, y L, Almeida. (1994). Relaciones fitogeograficas de la flora vascular de la reserva del Pedregal de San Ángel, México, Pp83-89 DF. En: Rojo, A. (com.) Reserva Ecológica el Pedregal de San Ángel: Ecología, Historia natural y Manejo. UNAM, México.
- Hillis D.M., Frost J.S., Wright D. (1983). Phylogeny and Biogeography of the *Rana pipiens* complex: a biochemical evaluation. *Syst. Zool* .**32**,132-143.
- Hillis D.M., y J.S. Frost. (1985). Three new species of Leopard Frogs (*Rana pipiens* complex) from the mexican plateau. *Occasional Papers of the Museum of Natural History The University of Kansas*. **117**, 1-14.
- Hillis D.M., y T.P., Wilcox . (2005). Phylogeny of the New World true frogs (Rana). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **34**, 299-314.

Hofrichter R, A, Goldschmid, A, Lametschwandtner, F, Uiblein, R, Schabetsberger. (2000). Amphibians: The world of frogs, toads, salamanders and newts. Firefly Books. 264 pp.

Korky J, y R, Webb. (1992). A redescription of the larvae of *Rana montezumae* (Anura:Ranidae). *Bull. Maryland Herp. Soc.* **28**,54-64.

Rojo A. (Compilador) (1994). Reserva Ecológica "El pedregal de San Ángel: Ecología, Historia Natural y Manejo. México DF. UNAM. Pp.383-385 pp.

Rudich de la Rosa JP. (1980). Sinopsis Biológica y de la explotación sobre las principales especies del genero *Rana* en México. Tesis Profesional de Biología. Facultad de Ciencias, UNAM.

Rzedowski J. (1954). Vegetación del Pedregal de San Ángel (Distrito Federal, México) *An. Esc. Nac. Cien. Biol., Méx. IPN.* **8**, 59-129 pp.

Taylor E.H. (1942). Tadpoles of Mexican anura. *UK Sci. Bull.* **28**, 37-55.

Uribe P.Z, B.A., Ramírez, A.G., Casas. (1999) Anfibios y reptiles de la serranías del Distrito Federal, México. Cuadernos 32. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. 119 pp.

Valiente-Banuet A, y G.E., De Luna. (1990) Una lista florística actualizada para la reserva del Pedregal de San Ángel, México, DF. *Acta Botánica Mexicana*, **9**,13-30.

Zaldivar-Riverón A, V, León-Regagnon, A, Nieto-Montes de Oca. (2004). Phylogeny of the Mexican costal leopard frogs of the *Rana berlandieri* group based on mtDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* **30**, 38-49.

## Especie del género *Rana* en los estanques del Jardín Botánico de la UNAM.

### 2.1 INTRODUCCIÓN

En general, se puede considerar que los estudios moleculares y los estudios morfológicos se complementan, ya que los caracteres moleculares son útiles donde los morfológicos son limitados (Hillis 1987; Hillis y Moritz 1990). Las tres principales aplicaciones de la sistemática molecular son: estudios de la estructura poblacional, identificación de límite de especie y estimación de filogenias (Hillis 1996). Una de las varias ventajas de la genética molecular puede ser el encontrar respuesta al problema de delimitación de especie, el análisis de fragmentos de DNA puede ser de utilidad en la identificación del límite de especies (Hillis 1996).

#### 2.1.1 DNA ribosomal

Goebel *et al.* (1999) presentaron oligonucleótidos, los cuales proporcionan exitosamente la secuencia de datos en bufónidos y otros anuros para regiones de DNA mitocondrial, entre ellas el DNA ribosomal 12S.

El 12S rDNA codifica para una subunidad pequeña del ribosoma mitocondrial, el cual juega un rol crítico en la síntesis de proteínas. La subunidad pequeña ribosomal DNA (llamada 12S rDNA en eucariotes) evoluciona lentamente (Goebel *et al.* 1999). Estos tienen muchos sitios que están restringidos por función, incluyendo la estructura secundaria y terciaria; esta ha provisto la resolución entre profundas divergencias, así mismo como en el caso de taxones cercanamente relacionados (Goebel *et al.* 1999).

La región control típica es usada para identificar las relaciones cercanas entre linajes relacionados, ya que este tiene diversión sitios que no son restringidos por función y además evoluciona rápidamente (Goebel *et al.* 1999). Aunque actualmente es más utilizada, la porción central conservada ha sido exitosa entre linajes moderadamente divergentes (Goebel *et al.* 1999).

El oligonucleótido 12SJ-L incluye cuatro sitios con secuencias redundantes y fue diseñado con base en alineamientos de 12S rDNA de muchos animales (Goebel 1998). El oligonucleótido 12SK-H fue diseñado por secuencias editadas de *Rana* y *Xenopus* y secuencias obtenidas de *Bufo* (Goebel 1998) (Fig. 2.1.).

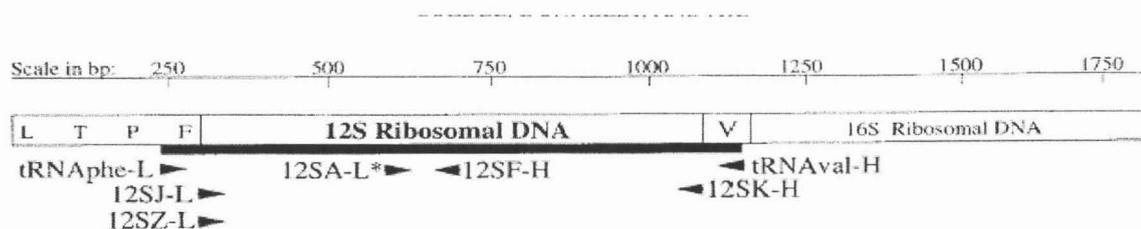


FIG. 2.1. Mapa de DNA mitocondrial mostrando la localización de los oligonucleótidos que amplifican DNA en *Bufo*, *Rana* y tetrápodos. Las abreviaciones estándar están usadas para RNA de transferencias y genes DNA mitocondriales Tomado de Goebel *et al.* (1999).

La dificultad para delimitar especies por medio de caracteres morfológicos es conocida por los taxónomos. Se sabe que el género *Rana* presenta una morfología conservada (Zaldivar *et al.* 2004), y es posible que no haga una identificación precisa de las especies del género, cuando los individuos no son adultos o acaban de efectuar la metamorfosis. En los estanques del Jardín Botánico de la UNAM se tiene el registro de la presencia de *Rana montezumae* desde 1994 (ejemplar depositado en la Colección Nacional de Anfibios y Reptiles del Instituto de Biología de la UNAM); al realizar un estudio ecológico (ver capítulo 3) de la población de anfibios encontrados en los estanques, se tuvo problemas en la identificación de metamórficos encontrados en los sitios de estudio, por lo cual se realizó un análisis molecular por medio del gen 12 S rDNA, para tratar de confirmar la presencia de *Rana montezumae* en el Jardín Botánico de la UNAM.

## 2.2 OBJETIVO

Identificar a nivel de especie los ejemplares del género *Rana* que habitan en el Jardín Botánico de la REPSA por medio de técnicas de sistemática molecular utilizando el gen ribosomal 12S.

## 2.3 MATERIAL Y MÉTODO

### 2.3.1 TRABAJO DE CAMPO

El estudio se llevó a cabo en el Jardín Botánico de la REPSA (ver capítulo 1) . El estudio se realizó en 3 estanques donde se confirmó la presencia del género *Rana* (Fig. 1.5 capítulo 1).

Durante el periodo comprendido entre marzo del 2003 y mayo del 2004, se realizaron muestreos 1 vez por semana en los 3 diferentes estanques. Estos muestreos comprendieron 59 días y 295 horas. Utilizando redes de cuchara, se capturaron organismos recién eclosionados, larvas, metamórficos y adultos. Cada larva y metamórfico capturado, le fue medido la Longitud Hocico-Cloaca (LHC) y se determinó el estado de desarrollo (GSD; Gosner 1960). A cada adulto encontrado, se le midió la Longitud Hocico Cloaca (LHC), y se le determinó el sexo. Todos los ejemplares fueron medidos en el lugar de captura y regresados a su estanque; en caso de ser metamórficos y adultos fueron marcados por corte de falanges mismas que se utilizaron para el estudio de biología molecular. En el caso de las larvas, a algunas se les tomó un poco de tejido de la cola para el estudio molecular. De los ejemplares de los que se tomó tejido, se obtuvo la Longitud Hocico-Cloaca, se registró en hojas de campo el número de estanque, tipo de tejido y características especiales que destacaran de cada ejemplar.

Se realizó un análisis morfométrico de una hembra de *Rana montezumae*, para corroborar la descripción de la especie, considerando los siguientes caracteres: Longitud Hocico-Cloaca, separación de los nostrilos, ancho anterior del ojo, ancho posterior del ojo, ancho de la cabeza, longitud de la cabeza, distancia de ojos-nostrilos, diámetro del tímpano, longitud del ojo, longitud del muslo, longitud de la tibia, longitud del pie, ancho máximo del tercer y cuarto dedo. Usando un vernier mecánico (mm). Dichas medidas se tomaron tal como lo propone Hayek *et al.* (2001) para ejemplares del género *Rana*.

TABLA 2.1 Tejidos procesados del género *Rana* en el Jardín Botánico de la UNAM.

Número	Estadio de desarrollo Según GSD	Longitud Hocico-cloaca	Estanque #	Tipo de tejido	Características
1	46	31.6	2	Falanges	
2	46	27.3	2	Falanges	
3	31	25.2	1	Cola	
4	46	83.9	3	Falanges	
5	45	----	1	Falanges	
6	29	26.9	1	Cola	
7	46	65	3	Muslo	Encontrado con hongos
8	45	----	1	Piel	Miembro supernumerario

### 2.3.2 TRABAJO DE LABORATORIO

Las técnicas de laboratorio para preparar la secuenciación se realizaron en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología, UNAM.

### 2.3.3 EXTRACCIÓN DE DNA

El DNA genómico total fue extraído de aproximadamente 25mg de tejido (Músculo, falanges, tejido de cola, piel ) siguiendo el protocolo de extracción del KIT Quiagen que se describe a continuación:

- 1.- Corta 25 microgramos de tejido en pequeñas piezas y colócalas en un tubo de 1.5 microlitros y agrega 180 microlitros de Buffer ATL, tritura el tejido congelado en nitrógeno.
- 2.- Agrega 20 microlitros de proteinaza K y mezcla en el vortex, incuba a 55° C hasta que el tejido este desecho completamente (aproximadamente 24 horas), mezclado en el vortex ocasionalmente durante la incubación. Agrega 4 µl de RNasa mezcla en el vortex e incubado por 2 minutos a temperatura ambiente.
- 3.-Mezcla en el vortex por 15 segundos y agrega 200 microlitros de Buffer AL para que la muestra se mezcle ponlo de nuevo en el vortex e incuba a 70°C por 10 minutos.
- 4.-Agrega 200 microlitros de etanol (96-100%) a la muestra y mezcla en el vortex.
- 5.- Pipetea la mezcla del paso 4 dentro de una columna Dneasy spin y colocala en un tubo colector de 2ml. Centrifuga a >6000 x g (8000 rpm). Desecho lo colectado en el tubo.
- 6.- Coloca la columna DNeasy en un tubo colector nuevo de 2 µl agrega 500 microlitros de Buffer AW1 y centrifuga por 1 minuto a ≥6000 x g (8000 rpm). Desecha el contenido del tubo colector.

7.- Coloca la columna DNesy en un tubo colector de 2 ml agrega 500 microlitros de Buffer AW2 y centrifuga por 3 minutos a la máxima velocidad para secar la membrana desecha el contenido del tubo colector

8.-Coloca la columna DNeasy en un tubo limpio de 2 µl y pipetea 200 microlitros de buffer AE directamente sobre la membrana e incuba a temperatura ambiente por 1 minuto y después centrifuga a 1 minuto a  $\geq 6000xg$  (8000 rpm)

9.-Repite el paso 8, descrito anteriormente

### 2.3.4 AMPLIFICACIÓN POR PCR

Posteriormente se evaluó la extracción de ADN en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE y se corrió a 120 voltios por 25 minutos. Una vez corroborada la presencia de DNA en las muestras, se realizó la reacción de PCR (Polymerase Chain Reaction). El producto amplificado fue de aproximadamente 778pb, fragmento del gen 12S rDNA.

Zaldivar *et al.* (2004) utilizan los siguientes oligonucleótidos que también fueron usados para la amplificación y reacción de secuenciación de éste estudio (5'-3'): 12SJ-L: AAAGRTTTGGTCCTRRSCTT; 12SK-H TCCRGTA YRCTTACCDTGTTACGA.

El programa de PCR para amplificación se describe en la siguiente Tabla:

TABLA.2.2 Programa para amplificación utilizada para las muestras del genero Rana en el Jardín Botánico de la UNAM.

	FASE	12S
29 Ciclos	Desnaturalización inicial	96° C 2 minutos
	Desnaturalización	94° C 30 segundos
	Alineación	50° C 45 segundos
	Extensión	72° C 1 minuto y 30 segundos
	Extensión final	72° C 10 minutos

Se preparó una reacción de 25 microlitros de PCR, el cual consistió en 2µl de templado de DNA, 0.5µl de cada uno de los primers, 0.25µl de dNTPs, 2.5µl de MgCl<sub>2</sub>, 2.5µl de 10x PCR buffer, 0.125µl de taq DNA polimerasa (Kit Applied Biosystems) y 16.125µl de H<sub>2</sub>O. Se utilizó una PCR marca Eppendorf Mastercycle Gradient modelo 5331.

Para evaluar el resultado del PCR se corrieron 2 microlitros de reacción con 3 microlitros de Loading buffer en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE a 120 voltios por 25 minutos y se identificaron las bandas en un transiluminador.

### 2.3.5 PURIFICACIÓN DE PCR

El producto de PCR fue purificado usando el siguiente protocolo:

- 1.- Se agrega 80µl de H<sub>2</sub>O, 10µl de acetato de sodio (3M pH=6.8) y 200 µl de etanol al 100% al tubo de PCR
- 2.- Se centrifuga a 13, 200 rpm a temperatura ambiente por 25 minutos.
- 3.- Se saca con una pipeta el líquido teniendo cuidado de no remover el pellet y se agrega etanol frío al 70% sin mezclar.
- 4.- Se centrifuga a 13, 200 rpm a temperatura ambiente por 20 minutos
- 5.- Se centrifuga en la vacofuga durante 10 minutos o hasta que se seque la muestra
- 6.- Se agrega 15 µl de H<sub>2</sub>O y se coloca la muestra a 4° C

### 2.3.6 SECUENCIACIÓN

Para la secuenciación de cada cadena se empleó un total de 2µl de Big Dye, 2µl de Half Buffer, 4.5 µl de H<sub>2</sub>O, 1µl de reacción limpia de PCR y 0.5µl de primer. (Kit Applied Biosystems).

El programa de PCR fue: 96° C durante tres minutos, para después iniciar una segunda desnaturalización a la misma temperatura en 10 segundos, la temperatura de alineación era de 50° C durante 5 segundos, para finalizar con la extensión a 60° C por 4 minutos; esta reacción se lleva a cabo por 25 ciclos.

Se realizó la limpieza con columnas de Sephadex (Centrisep, Centricon) siguiendo el siguiente protocolo:

- 1.- Colocar 750 ml de Sephadex hidratado en columnas Centrisep con tapa y dejar reposar por 10 minutos.
- 2.- Remover la tapa y dejar precipitar en tubos de colecta por 5 minutos y centrifugar a 2.7 rpm, por dos minutos.
- 3.-Agregar 10 µl de agua destilada estéril a la muestra y colocar en las columnas con Sephadex en tubos de 1.5 ml.
- 4.- Centrifugar a 2.7 rpm por dos minutos.
- 5.-Colocar los tubos en la centrífuga de vacío por aproximadamente 20 minutos hasta que la muestra se seque.

La reacción de secuenciación fue llevada a cabo por medio del secuenciador de ADN marca Applied Biosystems, modelo 310, en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología, UNAM.

### 2.3.7 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Se realizó la lectura de secuencias en ambas hebras, en la edición y alineamiento, a ojo, con la ayuda del programa Sequencher 4.2.2. Dicho alineamiento se llevó a cabo para todos los individuos procesados (Tabla. 2.1). Posteriormente fueron alineados con la secuencia de *Rana montezumae* obtenida del GenBank (GenBank AY115132), el grupo externo utilizado fue *Rana spectabilis* (GenBank AY115138) debido a la posible confusión en la determinación por caracteres morfológicos (Xochitl Aguilar com pers.) y a la reconocida distribución simpátrica entre estas especies (Flores-Villela, 1993; ver capítulo 1).

Se realizó un análisis de Neighbor-joining (Saitou y Nei 1987) para todos los individuos procesados. Para la realización del análisis se utilizó el programa PAUP 4.0b 10 (Swofford)

## 2.4 RESULTADOS

A continuación se enlistan los caracteres morfométricos tomados de una hembra adulta identificada como *Rana montezumae* y las medidas obtenidas se expresan en milímetros  
Tabla 2.2

Tabla 2.2. Medidas de un adulto hembra de *Rana montezumae* encontrado en el Jardín Botánico de la UNAM

VARIABLES	mm.
Longitud Hocico-cloaca	71.4
Separación de los nostrilos	3.5
Ancho anterior del ojo	7.9
Ancho posterior del ojo	8.4
Ancho de la cabeza	27.8
Longitud de la cabeza	24.9
Distancia de ojos-nostrilo	3.8
Diámetro del tímpano	6.4
Longitud del ojo	3.7
Longitud del muslo	36.7
Longitud de la tibia	37.2
Longitud del pie	56.2
Ancho máximo del tercer dedo	1.1
Ancho máximo del cuarto dedo	9

Se obtuvieron ocho secuencias de aproximadamente 778 pares de bases del gen ribosomal 12S. Las secuencias provenían de los ocho individuos encontrados en el Jardín Botánico de la UNAM de tres diferentes estanques estudiados.

De acuerdo con las secuencias obtenidas del gen 12S rDNA, la especie encontrada fue *Rana montezumae*, las secuencias de cada ejemplar encontrado se muestran en el Apéndice 3 y las características morfológicas que los diferencian en la Tabla 2.1.

Para obtener la topología se realizó un análisis de distancia por medio del algoritmo de Neighbor-joining (Saitou y Nei 1987) dado que esta herramienta permite analizar los datos completos y buscar el mejor agrupamiento de los individuos muestreados (Fig. 2.1).

## 2.5.DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El género *Rana* está caracterizado por poseer una remarcada y conservada morfología externa, razón por la cual ha sido históricamente difícil de determinar (Zaldivar *et al.* 2004), por ello cuando existen problemas en la identificación por medio de estudios morfológicos, es de utilidad para tratar de resolver las diferencias entre especies la biología molecular; por ejemplo Krupa *et al.* (2002) realizaron un estudio de biología molecular para asignar especies de larvas de *Triturus cristatus* y *Triturus marmoratus* que son indistinguibles morfológicamente.

Al comparar las secuencias de los ejemplares encontrados en el Jardín Botánico de la UNAM con las secuencias de *Rana montezumae* y *Rana spectabilis*, se pudo notar la marcada diferencia nucleotídica que existe entre las dos especies. Además de poder asegurar que la población de rana que habita en el Jardín Botánico de la UNAM pertenece a la especie *Rana montezumae*.

Las características morfológicas en adultos de *Rana montezumae* (ver capítulo 1) concuerdan con los resultados obtenidos en la topología realizada con las secuencias obtenidas del gen 12S DNA.

La filogenia del género *Rana* de las costas mexicanas, en base a secuencias de DNA mitocondrial (Zaldivar *et al.* 2004); concuerdan con la divergencia entre *Rana montezumae* y *Rana spectabilis*. Hillis y Wilcox (2005) realizaron la filogenia del género *Rana* presente en el continente americano, concordando con los resultados previstos.

El movimiento de los organismos en ambientes heterogéneos o fragmentados se ha estudiado usando diversas metodologías, principalmente estudios de observación directa y de marcaje-recaptura (Turchin 1998). En este estudio los organismos estudiados se marcaron por medio de corte de falanges para identificación y seguimiento poblacional. Un individuo marcado en el estanque 1 se recapturo en el estanque 2, por lo que podemos advertir que existe un intercambio de individuos entre cada estanque, posiblemente la migración a otros sistemas acuáticos encontrados en el sitio le pudieran conferir un nuevo hábitat reproductivo.

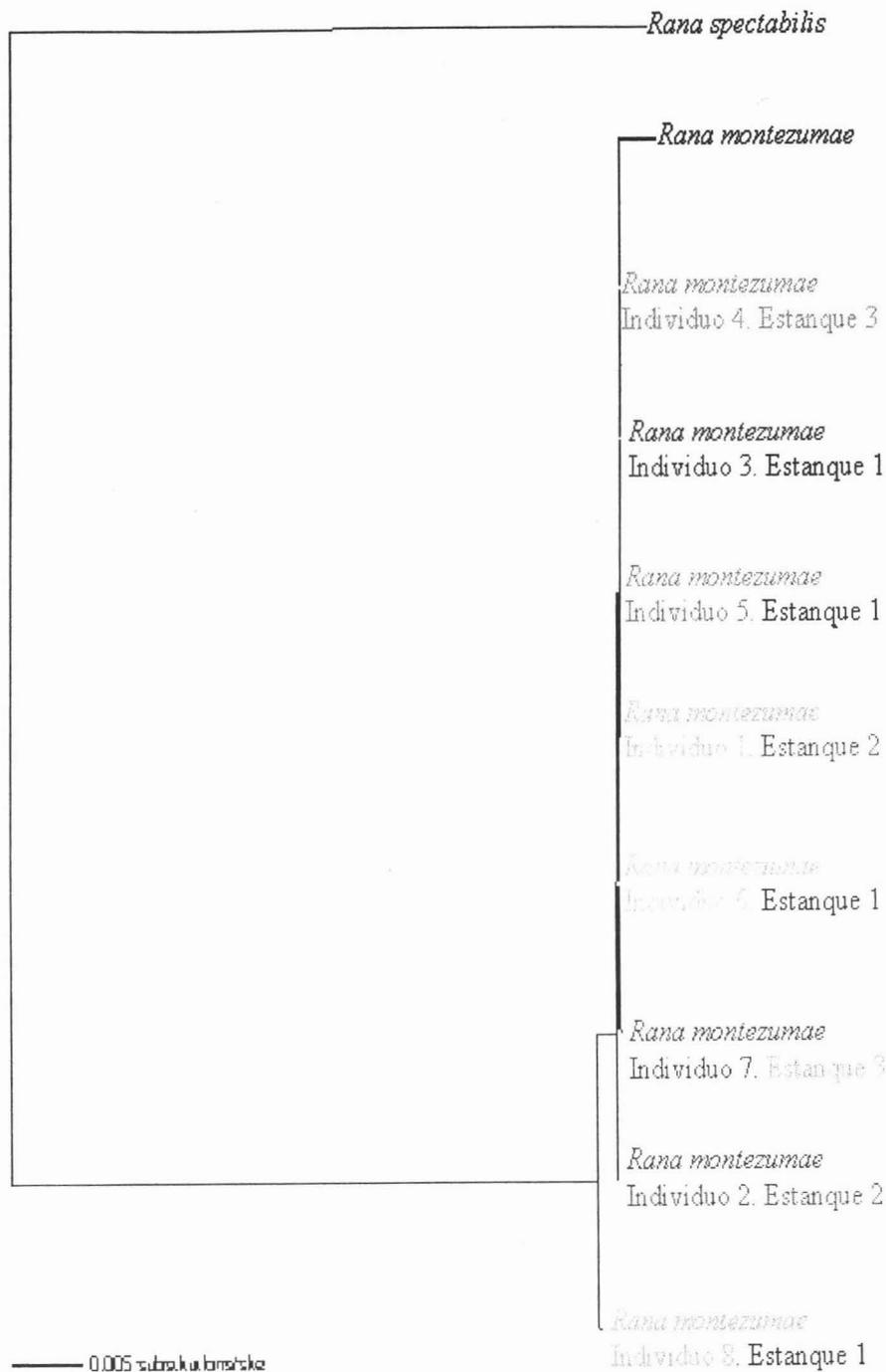


Fig. 2.1. Árbol Neighbor-joining (Saitou y Nei 1987) para todos los individuos encontrados en el Jardín Botánico de la UNAM. Las características de cada individuo se pueden observar en la Tabla. 2.1. Las características de cada estanque y lugar de estudio se puede ver en el capítulo 1.

Los anfibios son frecuentemente filopátricos, esto permite la distinción de poblaciones, y puede ser representado como una única entidad génica a pesar de la proximidad geográfica (Kimberling *et al.* 1996). No existe una diferencia marcada en la población de *Rana montezumae* entre los diferentes estanques como es de esperarse.

Según la topología presentada en la Fig. 2.1 es muy posible que la colonización de *Rana montezumae* haya empezado en el estanque número 1. El estanque número 2 es el más cercano al estanque número 1 (ver capítulo 1. Fig.1.6), posiblemente primero ocurrió una migración al estanque 2 y luego una migración posterior al estanque número 3. Esto mismo se comprueba con la topología, ya que la única distancia genética fácilmente reconocible está entre un ejemplar del estanque 1 y los demás ejemplares.

## 2.6 BIBLIOGRAFÍA

Flores-Villela O. (1993). Herpetofauna Mexicana. Lista anotada de las especies de anfibios y reptiles de México, cambios taxonómicos recientes y nuevas especies *Carnegie Museum of Natural History. Special Publication* No 1. 22 pp.

Goebel A.M., J.M., Donnelly, M.E., Atz. (1999). PCR primers and amplification methods for 12S ribosomal DNA, the control region, cytochrome oxidase I, and cytochrome *b* in bufonids and other frogs, and an overview of PCR primers which have amplified DNA in amphibians successfully. *Mol. Phylogenet. Evol.* **11**,163-199.

Hayek Lee-Ann C., W. R. Heyer, C. Gascon. (2001). Frog morphometrics: a cautionary tale. *Alytes*, **18**,153-177.

Hillis D.M. (1987). Molecular versus morphological approaches to systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, 23-42.

Hillis D.M., y C. Moritz. (1990). An overview of applications of molecular systematics. In Hillis, DM and C. Moritz (eds), *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Sunderland. Pp 502-515.

Hillis D.M., C. Moritz, B.K., Mable.(1996). *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts U.S.A.

Hillis D.M., y T.P., Wilcox (2005). Phylogeny of the New World true frogs (*Rana*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **34**, 299-314.

Kimberling D.N., A.R. Ferreira, S.M., Shuster, P. Keim. (1996). RAPD marker estimation of genetic structure among isolated northern leopard frog populations in the south-western USA. *Mol Ecol.* **5**, 521-529.

Krupa A.P., R. Jehle, D.A. Dawson, L.K. Gentle, M. Gibbs, J.W. Arntzen, T. Burke. (2002). *Conservation Genetics*. **3**, 87-89.

Saitou N., y M. Nei. (1987). The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing trees. *Molecular Biology and Evolution*. **4**,406-425.

Turchin P. (1998). *Quantitative analysis of movement. Measuring and modeling population redistribution in animals and plants*. Sunderland, Massachusetts. 396 pp.

Zaldivar-Riverón A, V. León-Regagnon, A. Nieto-Montes de Oca. (2004). Phylogeny of the Mexican coastal leopard frogs of the *Rana berlandieri* group based on mtDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **30**, 38-49.

## **Fenología Reproductora y Plasticidad Fenotípica de *Rana montezumae* en el Jardín Botánico de la UNAM.**

### **3.1 INTRODUCCIÓN**

Hoy en día el estudio de la plasticidad fenotípica y ambientes heterogéneos ha cobrado interés entre los biólogos evolutivos y ecólogos (Newman 1988a; Newman 1988b; Relyea 2001; Martínez-Solano *et al.* 2003). Los organismos que experimentan variabilidad ambiental pueden evitarla o ajustarse a ella; el proceso en el que se ajustan a la variabilidad ambiental, para producir fenotipos específicos, se le conoce como Plásticidad fenotípica (Relyea 2001).

Para realizar un estudio de plasticidad fenotípica primero se deben seleccionar e identificar los factores ambientales, documentar sus variables en escala espacio-tiempo, y registrar la variabilidad fenotípica en rasgos morfológicos. El siguiente paso es estudiar la posible relación entre la respuesta de la variabilidad fenotípica bajo cada variable (Newman 1988a; Martínez-Solano *et al.* 2003). Las respuestas plásticas de los organismos están inducidas por numerosas condiciones ambientales, incluyendo factores abióticos como: inundaciones, temperatura, luz, nutrientes y factores bióticos como la presencia de competidores, herbívoros y depredadores (Relyea 2001). Del mismo modo hay numerosas posibles respuestas a estos factores ambientales, incluyendo cambios en la historia de vida, fisiología, comportamiento y morfología (Relyea 2001). Un buen modelo para el estudio de interacciones genotipo-ambiente son los anfibios que habitan áreas donde están sometidas a estrés hídrico (Newman 1988a; Newman 1988b; Kiesecker y Blaustein 1999; Relyea 2001; Pfennig y Murphy 2002; Martínez-Solano *et al.* 2003).

En ambientes acuáticos desfavorables, las larvas de anfibios pueden acelerar sus rasgos de desarrollo y efectuar la metamorfosis a un tamaño corporal mínimo y continuar creciendo en tierra (Wilbur *et al.* 1973; McDiarmind *et al.* 1999), viéndose beneficiados al escapar de una posible mortalidad. Sin embargo estas adecuaciones pueden ocasionar grandes costos, reflejados en la supervivencia de juveniles, cambios fisiológicos y tamaño de la primera reproducción (Denver *et al.* 1998). Sin embargo, si las condiciones acuáticas fueran favorables, los renacuajos podrían tener un rápido crecimiento y de esta manera disminuir sus rangos de desarrollo y realizar la metamorfosis a un tamaño corporal más grande (Wilbur *et al.* 1973; McDiarmind *et al.* 1999).

La fenología, es interpretado por Krebs (1985) como los cambios estacionales que se pueden sobreponer al calendario astronómico y así indicar acontecimientos biológicos, es descrita en la población de *Rana montezumae*. Para ello se realizó un seguimiento del desarrollo de las larvas desde su eclosión hasta su metamorfosis, se observó la preferencia de sitios de puestas, periodos de máxima actividad reproductora y la relación entre el crecimiento y su diferenciación entre los sitios de puesta.

### 3.2. OBJETIVOS

Describir la fenología reproductora y el seguimiento del desarrollo larval de *Rana montezumae* en diferentes sitios de selección de puestas en estanques del Jardín Botánico de la REPSA.

Analizar si existen diferencias significativas en el tamaño de los individuos metamórficos entre los diferentes estanques estudiados.

Analizar si existen diferencias significativas en el tamaño de las larvas y su estadio de desarrollo (GSD) entre los diferentes estanques estudiados.

Analizar si existe una correlación entre el crecimiento y diferenciación de las mismas entre los diferentes estanques estudiados.

### 3.3. MATERIAL Y METODO

El estudio se llevo a cabo en el Jardín Botánico de la REPSA (ver capítulo 1). El estudio se realizó en 3 estanques por confirmarse la presencia de *Rana montezumae* y por las condiciones de mantenimiento (Fig. 1.5 capítulo 1). El estanque #1 es permanente, no fue vaciado para limpieza y cuenta con movimiento continuo de agua, así como de limpieza constante de basura superficial. Estanque #2 es permanente, tiene baja cantidad de agua a lo largo de todo el año, es vaciado constantemente para limpieza, no cuenta con movimiento de agua. Estanque #3 tiene un nivel alto de agua durante todo el año, pero es vaciado en ocasiones para limpieza, no posee mantenimiento y no cuenta con movimiento de agua (Tabla 3.1).

Para mayor detalle del sitio de estudio y los estanques ver capítulo 1.

TABLA 3.1. Categoría de sitios de crianza y sus propiedades como sistemas acuáticos para la reproducción de anfibios.

Tipo	Estabilidad	Predictabilidad de limpieza
Estanque 1	Alta	Media
Estanque 2	Media	Baja
Estanque 3	Baja	Baja

Para clasificar a los ejemplares, se utilizó la tabla de desarrollo para anuros de Gosner (1960), a partir de la cual se consideró como categoría de eclosionados el estadio 25, para larvas los estadios 26-41, para metamórficos los estadios 42-45, y postmetamórficos y adultos el estadio 46.

Durante el periodo comprendido entre marzo del 2003 y mayo del 2004, se realizaron muestreos 1 vez por semana en los 3 diferentes estanques. Estos muestreos comprendieron 59 días y 295 horas. Utilizando redes de cuchara, se capturaron organismos recién eclosionados, larvas, metamórficos y adultos. Cada larva y metamórfico capturado, le fue medido la Longitud Hocico-Cloaca (LHC) y se determinó el estadio de desarrollo (GSD; Gosner 1960). A cada adulto encontrado, se le midió la Longitud Hocico Cloaca (LHC), y se le determinó el sexo. Todos los ejemplares se midieron en el lugar de captura y regresados a su estanque; en caso de ser metamórficos y adultos fueron marcados por corte de falanges. Para una rápida observación de los individuos adultos se colocó una liga pequeña de color que funciona como pulsera alrededor de cada una de las rodillas de los anfibios encontrados con el fin de evitar recapturas del mismo ejemplar.

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete STATISTICA 5.5. Las pruebas para comprobaciones significativas (Post-hoc) se realizaron según Zar (1996). La prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis fue realizada para probar diferencias significativas en el tamaño Longitud Hocico-Cloaca (LHC) y estadio de desarrollo (GSN) entre los estanques, así como también probar las diferencias en las medias de post-metamórficos (GSN>42) en el rasgo de LHC a través de los estanques. Se realizó una prueba de correlación de rangos "Sperman" para analizar la relación entre el tamaño LHC y diferenciación de todos los estadios de desarrollo entre los diferentes estanques estudiados.

### 3.4.RESULTADOS

#### 3.4.1 RESULTADOS GLOBALES

Un total de 1225 eclosionados, 1435 larvas, 58 metamórficos, 53 post-metamórficos y adultos, fueron capturados en todos los sitios de muestreo. Los resultados por estanque se muestran en la Tabla. 3.2

TABLA 3.2 Número total de individuos colectados por estanque y su categoría de desarrollo

Estanque #	Estabilidad	Número de Larvas	Número de Metamórficos	Número de Post-metamórficos y adultos	Total
1	Alta	565	50	26	641
2	Media	132	2	9	143
3	Baja	738	6	18	762

### 3.4.2 FENOLOGÍA REPRODUCTORA

En la población de *Rana montezumae* encontrada en los tres estanques del Jardín Botánico la etapa de huevos fué encontrada de febrero a octubre. Estos se observaron cerca de la superficie, depositados en piedras, tallos y hojas de *Nimphaea* sp, así como en relieves. Las larvas fueron encontradas durante todo el año. Los jóvenes metamórficos se hallaron desde abril a octubre. Los adultos se pudieron observar de febrero a diciembre, no obstante desde octubre hasta febrero se detectó una baja actividad (Fig. 3.1).

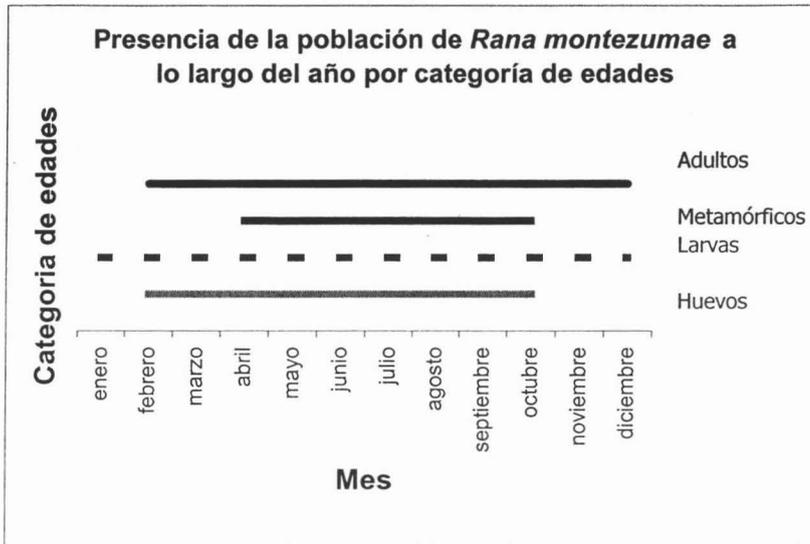


FIG3.1. Presencia de *Rana montezumae* por categoría de edades a través del año de estudio en el Jardín Botánico de la REPSA.

Un mayor porcentaje del número total de renacuajos tuvieron un estadio de desarrollo 26 (Fig. 3.1.1) (Tabla. 3.3). En el estanque #1 la proporción de renacuajos en estadio GSD 26 después del pico de máxima densidad (julio) presenta picos adicionales que van disminuyendo gradualmente conforme transcurre el año (Fig. 3.2). En el estanque #2 la proporción de renacuajos en estadio GSD 26 decrece abruptamente después del pico de máxima densidad (mayo) (Fig. 3.3). En el estanque #3 la proporción de renacuajos estadio GSD 26 va aumentando hasta alcanzar el pico de máxima densidad (enero) y después va disminuyendo en el transcurso del año (Fig. 3.4).

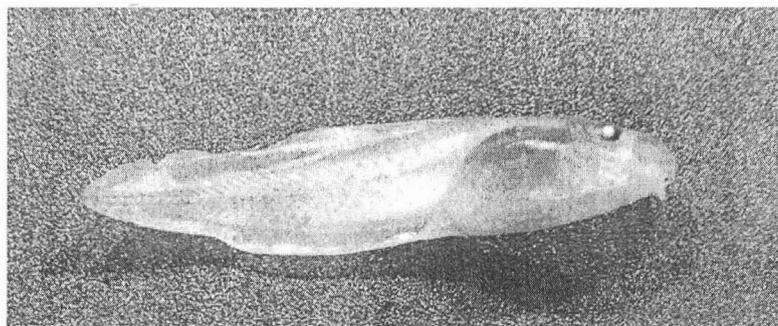


FIG.3.1.1. Renacuajo de *Rana montezumae* en estadio de desarrollo 26 según (GSD) del Jardín Botánico de la UNAM.

TABLA. 3.3. Estadística descriptiva del rasgo Longitud Hocico-Cloaca (LHC) medidos a las larvas de *Rana montezumae* en diferentes estadios de desarrollo (GSD, Gosner 1960) en tres diferentes categorías de reproducción . SD= Desviación estándar, Estanque #, N= tamaño de muestra.

	GSD	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
#1	MEDIA	18	20.7	21.6	22.5	22.7	23.2	26.9	25.5	26.9	31.3	29.4	32	36.2	40	36.1	37	32.9	33.3	34.4	37.1	40.2
	SD	2.75	3.29	4.11	2.14	3.75	3.64	4.79	4.3	4.69	6.5	5.77	5.48	5.78	4.8	4.59	0	2.86	2.41	3.79	3.25	9.02
	N	90	55	48	12	85	89	18	19	45	23	26	23	14	14	3	1	4	6	13	27	26
#2	MEDIA	14.5	16.9	18.4	20.1	19.8	19.1	26.2	26.3	26.5	29.4	34	31	34	34	0	0	0	0	30	35	36.9
	SD	2.32	4.63	6.31	3.13	3.15	1.92	1.34	4.11	0	5.39	4.35	0.64	0	0	0	0	0	0	0	0	8.59
	N	52	18	13	6	13	9	5	5	1	3	3	2	1	1	0	0	0	0	1	1	9
#3	MEDIA	17.5	21.1	23.3	25.1	24.4	30.3	27.6	27.1	31.2	33.2	33.9	34.3	34.5	36.4	36	40.8	30.9	27.6	28.3	33.9	61.9
	SD	2.81	2.95	3.01	1.61	3.72	3.87	3.13	3.46	4.38	4.47	4.13	4.81	3.49	2.09	4.36	0	0	0	0	1.42	19.5
	N	570	57	13	3	11	12	4	9	10	9	9	11	6	6	7	1	1	1	1	3	18

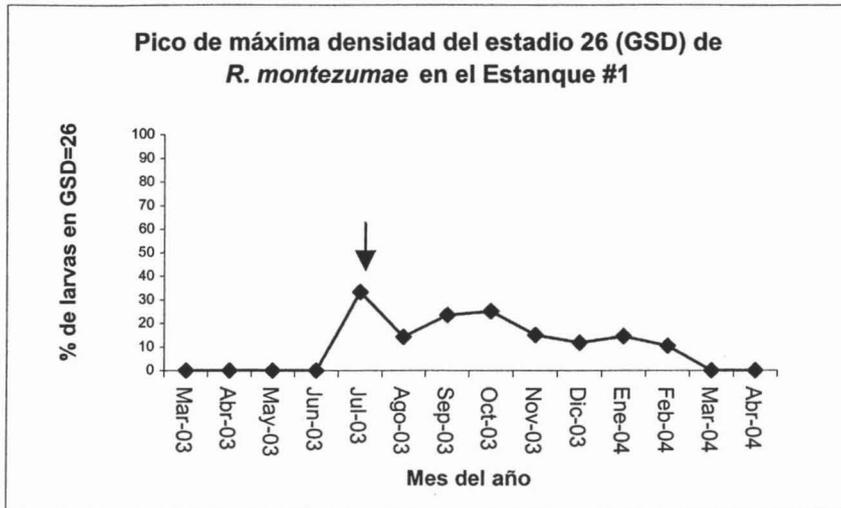


FIG.3.2. Porcentaje de renacuajos en GSD 26 a través del año en el sitio de crianza Estanque #1. 100% = número total de renacuajos muestreados en cada mes. Julio se indica como el periodo de máxima densidad (indicado por la flecha). Renacuajos en este estadio de desarrollo temprano, se encuentran presentes durante casi todo el año.

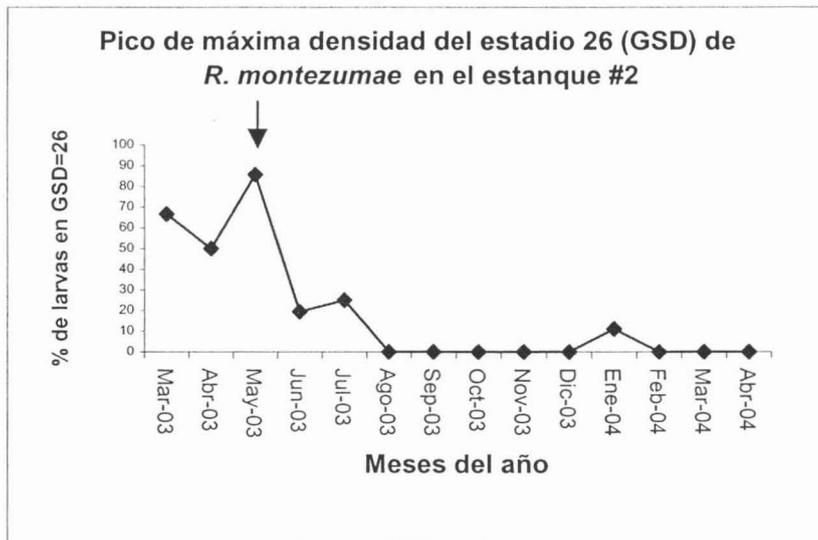


FIG.3.3. Porcentaje de renacuajos en GSD 26 a través del año en el sitio de crianza Estanque # 2. 100% = número total de renacuajos muestreados en cada mes. Mayo se indica como el mes de máxima densidad (indicado con la flecha).

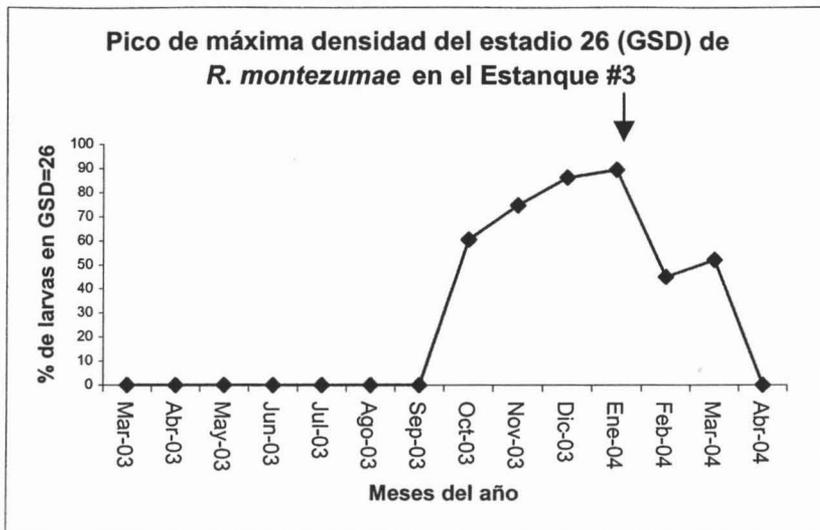


FIG.3.4. Porcentaje de renacuajos en estadio GSD 26 a través del año en el sitio de crianza Estanque # 3. 100% = número total de renacuajos muestreados en cada mes. Enero se indica como el mes de máxima densidad (indicado con la flecha).

### 3.4.3 PLASTICIDAD FENOTÍPICA

La descripción estadística de la longitud hocico-cloaca (LHC) de la *Rana montezumae* medidos a través de los sitios de crianza se muestran en la Tabla 3.3. Las varianzas encontradas en LHC asociadas con estadio de desarrollo (GSD) en el estanque 1, 2 y 3 se pueden observar en las Fig. 3.5, 3.6, 3.7 respectivamente.

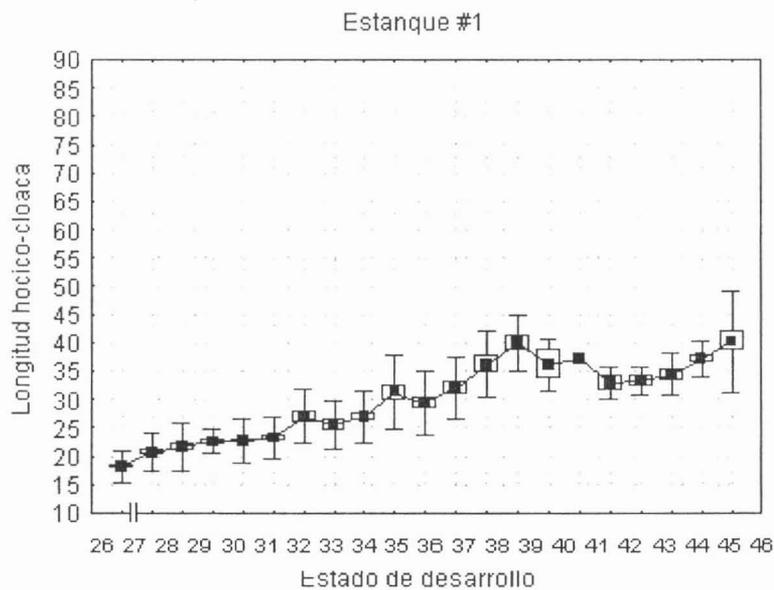


FIG 3.5. Media (línea y cuadro), error estándar (caja), desviación estándar (barras verticales) del rasgo longitud hocico-cloaca en cada estadio de desarrollo en el estanque #1

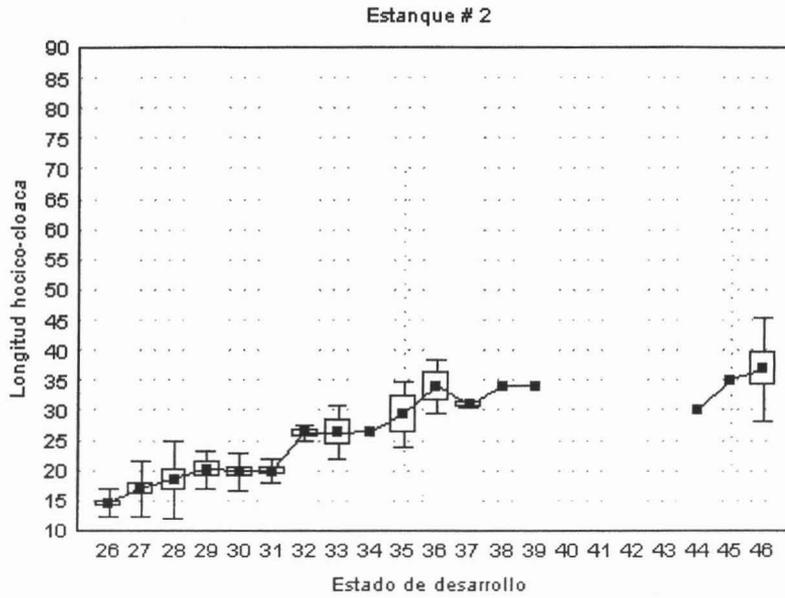


FIG 3.6. Media (línea y cuadro), error estándar (caja), desviación estándar (barras verticales) del rasgo longitud hoco-cloaca en cada estadio de desarrollo en el estanque #2.

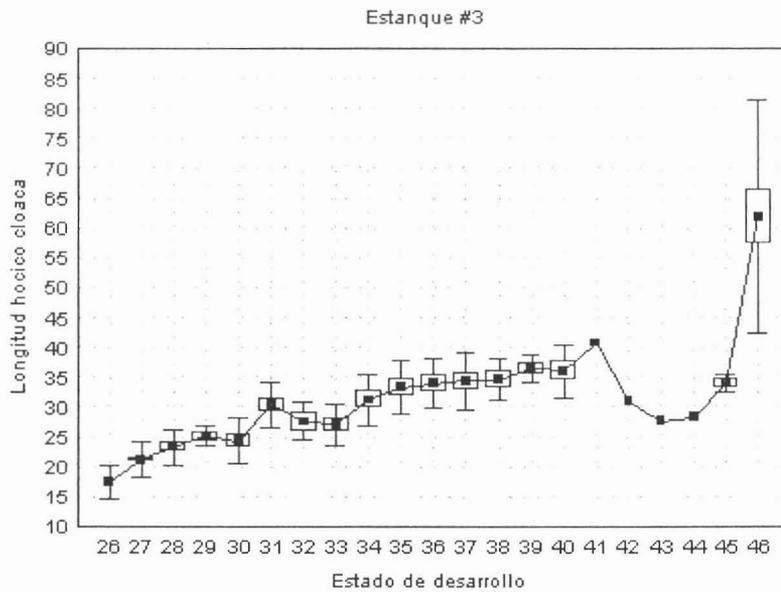


FIG 3.7. Media (línea y cuadro), error estándar (caja), desviación estándar (barras verticales) de longitud hoco-cloaca en cada estadio de desarrollo en el estanque # 3

Las larvas del estanque #1 realizan la metamorfosis a un tamaño mayor que las larvas de los estanques #2 y #3 (Prueba, Kruskal-Wallis, GSD 42 a 45  $H_{2,58} = 7.301712$   $P = 0.0260$ ).

Los resultados de la comparación del tamaño de longitud hocico-cloaca LHC en los tres estanques de los estadios de desarrollo (GSD) 26-41 se muestran en la Tabla 3.4. Los datos de los estadios de desarrollo (GSD) 40 y 41 no se sometieron a la prueba al no encontrar individuos en estos estadios de el estanque #2 (Tabla. 3.3).

No hay diferencias significativas en el tamaño de los estadios de desarrollo 32, 33, 35, 37, 38, 39 y el estadio 31 fue el más variable entre los estanques (Tabla. 3.4). En la mayoría de los casos las pruebas Post-hoc muestran que las diferencias significativas detectadas fueron relacionadas al tamaño pequeño y profundidad del estanque #2 con respecto a los estanques #1 y #3 (Tabla. 3.4).

Se analizó la relación entre el tamaño y diferenciación a través de los diferentes estanques, los datos de LHC de las larvas se correlacionaron con su estadio de desarrollo (GSD) en todas sus categorías. Todas las correlaciones fueron significativas con un  $P < 0.001$ . Para el estanque #1 Serman's  $r_s = 0.802576$ ; para el estanque #2 Serman's  $r_s = 0.813709$  y para el estanque #3 Serman's  $r_s = 0.676614$ .

TABLA. 3.4. Resultados de la prueba Kruskal-Wallis comparando tamaño en cada estadio de desarrollo GSD a través de los diferentes estanques. Las pruebas de comparaciones significativas fueron realizadas con la prueba Nemenyi para muestras de diferentes tamaños.

GSD	H	P	Comparaciones significativas Post-hoc
26	$H_{2,712} = 75.65575$	$= 0.00001$	2 vs 1 y 3
27	$H_{2,130} = 14.65917$	$= 0.0007$	2 vs 1 y 3
28	$H_{2,74} = 10.32512$	$= 0.0057$	2 vs 1 y 3
29	$H_{2,21} = 6.331169$	$= 0.0422$	2 vs 3
30	$H_{2,109} = 9.315845$	$= 0.0095$	2 vs 1 y 3
31	$H_{2,110} = 30.41596$	$= 0.0001$	Todos significativos
32	$H_{2,27} = 0.4679661$	$= 0.7914$	No significativo
33	$H_{2,33} = 1.568019$	$= 0.4566$	No significativo
34	$H_{2,56} = 7.866028$	$= 0.0196$	1 vs 3
35	$H_{2,35} = .8256114$	$= 0.6618$	No significativo
36	$H_{2,38} = 7.556905$	$= 0.0229$	1 vs 3
37	$H_{2,36} = 2.008184$	$= 0.3664$	No significativo
38	$H_{2,21} = 0.1509960$	$= 0.9273$	No significativo
39	$H_{2,21} = 4.991862$	$= 0.0824$	No significativo

### 3.5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Se encontraron diferencias en la historia de crecimiento que aparentemente está relacionados con los diferentes ambientes de los estanques utilizados por *Rana montezumae* en el Jardín Botánico de la REPSA. En conjunto la población de *Rana montezumae* presenta un ciclo continuo de reproducción ya que se observa asincronía poblacional. Las larvas con el estadio 26 están presentes a lo largo de todo el año del estudio; en cada sitio de anidada hay un periodo de máxima densidad, en las que no se sobreponen entre sí; cuando en un sitio disminuye el porcentaje de renacuajos en estadio 26 otro sitio presenta un aumento.

En los tres estanques se observa la disminución gradual en el número de larvas del estadio de desarrollo (GSD) 26, esto puede ser explicado por una posible diferenciación de los renacuajos a otros estadios de desarrollo más avanzados (Martínez-Solano *et al.* 2003) (Fig. 3.5, 3.6, 3.7). En el estanque #1 la presencia de renacuajos en estadio de desarrollo 26 (GSD) muestra un pico de máxima densidad y conforme va pasando el año va disminuyendo gradualmente (Fig. 3.2); a comparación de los estanques #2 y #3 (Fig. 3.3 y 3.4) en los que se observa un disminución drástica, esto podría ser explicado por el mantenimiento dado a los estanques donde son vaciados para su limpieza y solo algunas larvas sobreviven a este proceso.

En este estudio se observó que los individuos de *Rana montezumae* tienden a estar sometidos a estrés (cambios impredecibles de agua); sin embargo, no se tomaron en cuenta posibles efectos de otros factores como por ejemplo calidad de agua, densidad relativa, y depredación, que también podrían explicar las diferencias observadas en el crecimiento larval entre los estanques. Experimentos posteriores enfocados en estas aspectos podrían ayudar a verificar nuestra hipótesis.

Si las condiciones del medio acuático fueran desfavorables, los renacuajos podrían acelerar su desarrollo, realizar la metamorfosis a un mínimo tamaño corporal y continuar creciendo en tierra (Wilbur *et al.* 1973; McDiarmid *et al.* 1999). Si las condiciones fueran favorables, permitirían un rápido crecimiento, los renacuajo podrían disminuir sus rangos de desarrollo y realizar su metamorfosis a un tamaño corporal más grande ( Wilbur *et al.* 1973; McDiarmid *et al.* 1999). Las larvas del estanque #1 presentaron una diferencia significativa en las tallas al realizar la metamorfosis a un tamaño más grande que las larvas del estanque # 2 y # 3. Las características que poseen los estanques como sistemas acuáticos, indican que el estanque #1 tiene una alta estabilidad en comparación con los estanques #2 y #3 (Tabla. 3.1). Por consiguiente los renacuajos de los estanques #2 y #3 podrían acelerar su desarrollo, realizando más rápido su metamorfosis y continuar su crecimiento una vez terminada la metamorfosis.

Kiesecker y Blaustein (1999) estudiaron el efecto de *Saprolegnia* (Moho acuático patógeno de la familia Saprolegniaceae registrado como causantes de una alta mortalidad de huevos de anfibios Daszak *et al.* 2003) durante el desarrollo embrionario de *Rana cascadae* y observaron que las larvas en presencia de *Saprolegnia* disminuían el tiempo en el que realizaban la metamorfosis. Se encontraron anfibios parasitados con *Saprolegnia* sp y *Saprolegnia ferax* únicamente en el estanque #3 (ver capítulo 4) las larvas de este estanque presentaron una diferencia significativa al realizar la metamorfosis a un tamaño más

pequeño que las larvas del estanque #1, por consiguiente es posible que la presencia de *Saprolegnia* y las condiciones ambientales antes descritas hallan provocado el fenómeno. Sin embargo otros factores como la densidad o depredación pudieron jugar un papel importante en el fenómeno

La varianza en el desarrollo se detectó en la característica LHC asociada con estadio de desarrollo (GSD) a través de los diferentes estanques. La historia de crecimiento de las larvas muestra una alta variación en los estadios de desarrollo tempranos a diferencia de los estadios de desarrollo tardíos en larvas, probablemente relacionado a el tamaño pequeño y profundidad del estanque #2 (Tabla. 3.4).

Diferentes estrategias en el desarrollo confieren altas probabilidades de sobrevivencia local para permitir la explotación de hábitats reproductivos (Martínez-Solano *et al.* 2003). En el caso del Jardín Botánico de la REPSA donde existen pocos lugares disponibles para la reproducción, la habilidad de *Rana montezumae* en tener diferentes estrategias en el desarrollo puede ser importante para permitir la explotación de los pocos hábitats reproductivos.

La variabilidad en los patrones de crecimiento de *Rana montezumae* en el Jardín Botánico le confiere una estrategia y propone una mejor explicación de sobrevivencia de la rana en un hábitat heterogéneo, en condiciones poco favorables, al haber pocos lugares de crianza.

*Rana montezumae* se encuentra en el Jardín Botánico debido a que existe sitios de crianza en este caso los estanques. En los estanques artificiales donde habita *R. montezumae*, la disponibilidad de agua para la reproducción no es limitada pero el vaciado continuo para limpieza y el poco mantenimiento dado hacen del ambiente un lugar impredecible para habitar, imponiendo problemas para la sobrevivencia de la rana. La respuesta de la población podría ser la producción de variaciones en los patrones de crecimiento en los lugares donde se encuentre un mayor estrés.

### 3.6. BIBLIOGRAFÍA

- Denver R.J., N. Mirhadi, M. Phillips. (1998) Adaptive Plasticity in amphibian metamorphosis: response of *Scaphiopus hammondi* tadpoles to habitat desiccation. *Ecology*, **79**,1859-1872.
- Gosner K.L. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, **16**,183-190.
- Kiesecker J.M. y A.R. Blaustein. (1999) Pathogen reverses competition between larval amphibians. *Ecology*, **80**, 2442-2448.
- Krebs C.J. (1985) Ecología Estudio de la distribución y la abundancia. Harla México. 753 pp.
- McDiarmid R.W., R. Altig. (1999) GKJ Tadpoles the biology of anuran larvae. The University of Chicago Press, Chicago and London, 444 pp.
- Martínez-Solano I, M. París, E. Izquierdo, M. Garcia-Paris. (2003) Larval growth plasticity in wild populations of the betic midwife toad *Alytes dickhilleni* (Anura: Discoglossidae). *Herpetological Journal*, **13**,89-94.
- Newman R.A. (1988a) Genetic variation for larval anural (*Scaphiopus couchii*) development time in an uncertain environment. *Evolution*, **42**,763-773.
- Newman R.A. (1988b) Adaptive plasticity in development of *Scaphiopus couchii* tadpoles in desert ponds. *Evolution*, **42**,774-783.
- Pfennig D.W., y P.J. Murphy. (2002) How fluctuating competition and phenotypic plasticity mediate species divergence. *Evolution*, **56**, 1217-1228.
- Relyea R.A. (2001) Morphological and behavioral Plasticity of Larval anurans in response to different predators. *Ecology*, **82**,523-540.
- Willbur H.M., J.P. Collins. (1973) Ecological aspects of amphibian metamorphosis. *Science* **182**,1305-1314.
- Zar J.H. (1996) Biostatistical Análisis. Prentice may. 622 pp.

## **Enfermedades y Malformaciones de *Rana montezumae* en el Jardín Botánico UNAM**

### **4.1. INTRODUCCIÓN**

La pérdida global de anfibios es un fenómeno reconocido desde 1989. (Wake 1991; Blaustein y Kiesecker 2002; Collins y Storfer 2003). Para 1993 se calculó la disminución poblacional de más de 500 especies de ranas y salamandras (AmphibiaWeb 2005). Existen varias hipótesis sobre las posibles causas del fenómeno, que incluyen pérdida de hábitat o cambios en el uso del suelo, introducción de especies exóticas, sobreexplotación de especies de anfibios, cambios globales (radiación UV, calentamiento global), contaminantes y enfermedades (Young *et al.* 2001; Blaustein y Kiesecker 2002; Collins y Storfer 2003).

El factor más obvio causante de la disminución en las poblaciones de anfibios es la destrucción y alteración del hábitat (Parra-Olea *et al.* 1999; Blaustein y Kiesecker 2002), sin embargo, el aumento en la radiación UV-B también está involucrado en el fenómeno (Blaustein y Kiesecker 2002; Blaustein *et al.* 2003; Collins y Storfer 2003). Por otra parte, los cambios climáticos globales como modificaciones en la precipitación y temperatura han afectado la fenología de algunas especies de anfibios (Blaustein y Kiesecker 2002; Collins y Storfer 2003).

Se ha descrito que una amplia variedad de contaminantes como los herbicidas, los funguicidas, y los fertilizantes pueden eliminar directamente a los anfibios, afectar su comportamiento, reducir sus rangos de crecimiento, actuar en rupturas endocrinas o inducir inmunosupresión (Blaustein y Kiesecker 2002). La introducción de especies exóticas tiene el potencial de afectar a los anfibios en diferentes maneras (Blaustein y Kiesecker 2002). Las especies introducidas compiten con los anfibios nativos, transmiten enfermedades y/o son depredadores (Blaustein y Kiesecker 2002; Collins y Storfer 2003). El efecto de la captura y caza de poblaciones de anfibios es poco conocido, pero hay evidencia de que puede ser significativo (Collins y Storfer 2003).

Por otra parte se ha encontrado que una variedad de patógenos afectan las poblaciones de anfibios, y pueden ser la causa de muerte masiva de ellas (Blaustein y Kiesecker 2002). En lo que se refiere a las enfermedades de anfibios, los patógenos que se han descrito involucrados son virus, bacterias, parásitos, omicetes y hongos (Cunningham *et al.* 1996; Johnson *et al.* 1999; Kiesecker *et al.* 2001; Berger *et al.* 1999). Del efecto de los parásitos sobre los anfibios se conocían, hasta hacia un par de décadas (Santos-Barrera 2004); por ejemplo solo se conocían infecciones causadas por virus del tipo Ranavirus (Daszak *et al.* 2004), por bacterias como *Aeromonas hydrophila* que ocasiona la enfermedad de piernas rojas (Cunningham *et al.* 1996), por helmintos (Barton y Richards 1996), por hongos como por ejemplo *Basidiobolus ranarum* (Groff *et al.* 1991) y Cromomicosis que es una infección micótica por hongos septados y altamente pigmentados como *Fonsecaea pedrosi*, *Fonsecaea dermatitidis*, *Cladosporium* sp., *Scolecobasidium* sp., *Phialophora* sp. (Miller *et al.* 1992). En México, Parra-Olea y colaboradores (1999) encontraron una drástica disminución en las poblaciones de anfibios y evidencia de extinciones locales. Lips *et al.* (2004) documentan disminución, enfermedades y aparente extirpación de anfibios mexicanos. Sin embargo son pocos los registros de enfermedades infecciosas y es limitado

el conocimiento sobre su impacto en las poblaciones de anfibios en México. Por lo que es necesario evaluar el estatus de los anfibios mexicanos y realizar una detección espacio temporal de los patógenos causantes de enfermedades infecciosas y su efecto en la declinación de anfibios.

El hongo quitridio *Batrachochytrium dendrobatidis* causante de quitridiomycosis (Berger *et al.* 1999; Piotrowski *et al.* 2004), se ha encontrado en poblaciones de anfibios que habitan áreas protegidas y perturbadas de Centroamérica, Estados Unidos, España y Australia (Berger *et al.* 1998; Daszak *et al.* 1999; Lips 1999; Bosch *et al.* 2001; Bradley *et al.* 2002). En México la quitridiomycosis se ha registrado en ranas desde 1982 (Rollins-Smith *et al.* 2002), y solo se ha observado su presencia y sintomatología en los estados de Sonora (Rollins-Smith *et al.* 2002), Guerrero, Oaxaca y Chiapas (Lips *et al.* 2004) (Tabla.1).

Los mohos acuáticos del género *Saprolegnia* sp son causantes de la mortalidad de huevos de anfibios y se ha propuesto como causal del declive de *Bufo boreas* y de *Rana cascadae* (Daszak *et al.* 2003). Existen pocos registros de *Saprolegnia* sp como patógeno de anfibios y en los menos se identifica hasta la especie. Bragg y Bragg (1958) refieren que una infección por *Saprolegnia* eliminó renacuajos de *Scaphiopus bombifrons* en zanjas con agua limpia en Oklahoma. A la fecha *Saprolegnia ferax* es reconocida como un patógeno causante de una alta mortalidad de embriones de anfibios en el occidente de Estados Unidos de Norteamérica (Kiesecker *et al.* 2001).

Las malformaciones en anfibios están ocurriendo en muchos lugares del mundo y en todas las especies de anfibios (Sparling *et al.* 2000). Anormalidades en el desarrollo han sido descritas en el norte, centro y sur de América; Europa; África; Asia; y Australia (Sparling *et al.* 2000). En México en el estado de Chiapas se ha reportado de un individuo adulto de *Rana palmipes* con malformaciones en sus extremidades (Sparling *et al.* 2000). Algunas causas sugeridas en anormalidades de anfibios incluyen radiación UV-B, contaminantes, retinoides e infestación de parásitos (Johnson *et al.* 1999). De estos últimos se ha observado que la infestación de tremátodos del género *Ribeiroia* está vinculado con deformaciones físicas y extremidades supernumerarias en anfibios (Johnson *et al.* 1999; Johnson y Sutherland 2003). En presente trabajo se documentan evidencias de tres patógenos: el hongo quitridial *Batrachochytrium dendrobatidis*, los mohos acuáticos *Saprolegnia* y tremátodos del género *Ribeiroia*. Esto debido a la detección de malformaciones, evidencias y sintomatología de enfermedades en la población de *Rana montezumae* del Jardín Botánico de la Reserva Ecológica del Pedregal De San Ángel (REPSA).

#### 4.1.1 QUITRIDIOMICOSIS

Los hongos del Orden Chytridiales son principalmente acuáticos y pocos de ellos terrestres (Herrera y Ulloa 1998). Estos usualmente actúan como degradadores primarios o saprobios, usando sustratos con quitina, detritus de plantas y queratina (Berger *et al.* 1998). Algunos géneros son facultativos o anaerobios obligados, y muchos son parásitos obligados de hongos, algas, plantas vasculares, rotíferos, nemátodos o insectos (Berger *et al.* 1998). Longcore *et al.* (1999) describen a *Batrachochytrium dendrobatidis*, causante de quitridiomycosis en anfibios. Este quitridio es el primer miembro del Phylum Chytridiomycota en ser reconocido como un parásito del Phylum Vertebrata (Berger *et al.* 1998).

TABLA1. Presencia y sintomatología de quitridiomycosis en México

Estado de la Republica Mexicana	Especie	Fase de desarrollo	Sintomatología ó presencias de quitridiomycosis
Guerrero   (Lips <i>et al.</i> 2004)	<i>Eleutherodactylus saltator</i>	Adulto	Infectado
	<i>Ptychohyla erythromma</i>	Adulto	Infectado
	<i>Ptychohyla erythromma</i>	Larva	Perdida de partes bucales
	<i>Rana sierramadrensis</i>	Larva	Pérdida de partes bucales
Oaxaca    (Lips <i>et al.</i> 2004)	<i>Ptychohyla leonhardschultzi</i>	Larva	Pérdida de partes bucales
	<i>Hyla nephyla</i>	Larva	Pérdida de partes bucales
	<i>Hyla sabrina</i>	Larva	Perdida de partes bucales
	<i>Hyla cuclada</i>	Larva	Pérdida de partes bucales
	<i>Duellmanohyla ignicolor</i>	Larva	Pérdida de partes bucales
Chiapas  (Lips <i>et al.</i> 2004)	<i>Plectrohyla matudai</i>	Larva	Pérdida de partes bucales
	<i>Plectrohyla sagorum</i>	Larva	Pérdida de partes bucales
Sonora  (Rollins-Smith <i>et al.</i> 2002)	<i>Rana tarahumarae</i>	Adulto	Infectado

La mayoría de los quítridios presentan zoosporas flageladas que se desarrollan en un esporangio estacionario (Berger *et al.* 1999). Los esporangios de algunas especies de quítridios forman uno o más tubos de descarga a través de los cuales las zoosporas son liberadas (Berger *et al.* 1999). *Batrachochytrium* presenta tallos monocéntricos o coloniales, uno o muchos rizoides axiales parecidos a hilos (Longcore *et al.* 1999). Cada segmento del tallo colonial forma zoosporangios con una o más papilas de descarga sin opérculo (Longcore *et al.* 1999). Este hongo es claramente diferente de otros hongos quitridiales por su morfología ultraestructural característica, y su secuencia de 18s rDNA (Berger *et al.* 1998; Longcore *et al.* 1999; Berger *et al.* 1999).

Las larvas de anfibios son infectadas por *Batrachochytrium dendrobatidis* en sus partes bucales, que es la única área queratinizada de su piel (Berger *et al.* 1999). Fellers *et al.* (2001) describen las anomalías típicas que presentan los renacuajos infectados por este hongo que son: porciones o la totalidad de las hileras de dientes y vainas mandibulares blanquizas. Las hileras de dientes tienen a ser asimétricas bilateralmente, y será menos común los renacuajos que presentan un hinchamiento rojizo y anormal y/o las papilas enrojecidas.

Después de la metamorfosis de los renacuajos, la piel sobre el cuerpo empieza a queratinizarse permitiendo que la infección fúngica se disperse (Berger *et al.* 1999). Renacuajos de *Bufo marinus* infectados por quitridiomycosis sobrevivieron a la infección posterior de la metamorfosis pero de 2 a 3 semanas después presentaron una alta mortalidad (Berger *et al.* 1998; Berger *et al.* 1999). Cientos de sapos post-metamórficos de *Alytes obstetricans* fueron encontrados muertos por quitridiomycosis, alrededor de estanques en el parque Natural Peñalara en el centro de España (Bosch *et al.* 2001).

Actualmente se ha desarrollado toda una línea de investigación sobre enfermedades infecciosas de anfibios cuyo principal propósito es conocer el origen, diseminación y patogenicidad de *Batrachochytrium dendrobatidis* (Santos-Barrera 2004). De esta se manejan 3 métodos para la detección de *Batrachochytrium dendrobatidis* en la piel de anfibios.

- 1 Observación en fresco o preservados en colecciones científicas
- 2 Preparaciones histológicas
- 3 Detección por PCR de regiones ITS de rDNA

La histopatología de quitridiomycosis ese encuentra asociada con una hiperqueratosis focal y erosión en el área del *stratum corneum*, un engrosamiento de la epidermis (hiperplasia que puede estar presente), así como también una necrosis focal de las células epidérmicas y podría encontrarse un incremento insignificante en células inflamadas de la dermis (Berger *et al.* 1999b) ver Fig. 4.1 y 4.2. Los renacuajos pueden tener infecciones leves acompañadas con una mínima patología o infecciones severas con hiperqueratosis y en ocasiones presenta invasión bacteriana (Berger *et al.* 1999b) Fig. 4.3.

El diagnóstico del examen de quitridiomycosis en anfibios, puede clasificarse en negativos (no se encuentra el hongo quítridio), positivo (se encuentra el hongo quítridio), y sospechosos positivos (posible hallazgo del hongo quítridio pero se necesita confirmación) (Berger *et al.* 1999b).

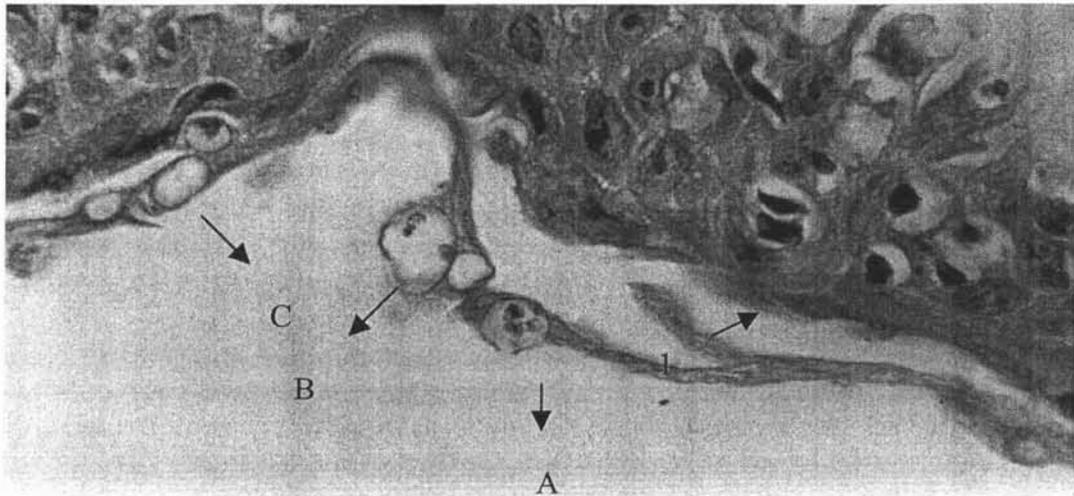


FIG.4.1 Corte histológico con diferentes estadios del patógeno. Esporangio listo para descargar las zoósporas (A). Esporangio después de la descarga de las zoósporas (B). Septación interna (C). Separación de la primera capa de la epidermis y erosión del *stratum corneum* (1). Tomado de Puschendorf (2004)

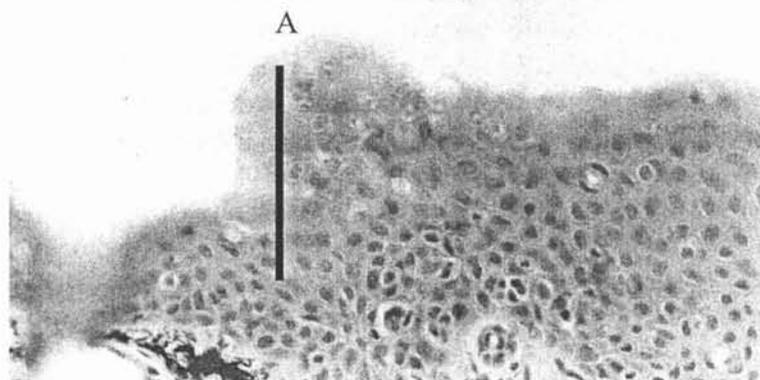


FIG 4.2. Corte histológico donde se muestra la inflamación de la epidermis (A) Tomado de Puschendorf. (2004).

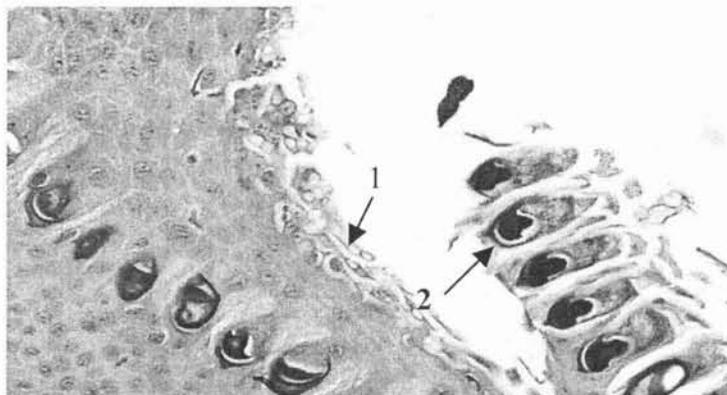


FIG 4.3. Corte histológico de las partes bucales de un renacuajo infectado con el quitridio (1). Se reconocen las partes bucales en color café oscuro (2). Tomado de Puschendorf (2004).

#### 4.1.2 SAPROLEGNIOSIS

La mayoría de las especies de *Saprolegnia* (Clase Oomycetes, Orden Saprolegniales, familia Saprolegniaceae) viven como sapróbias acuáticas o terrestres, algunas son parásitas (Herrera y Ulloa 1998), pueden infectar ciertos peces (Herrera y Ulloa 1998; Kiesecker *et al.* 2001b), embriones de peces y anfibios (Kiesecker y Blaustein 1999). Estos mohos acuáticos no son parásitos obligados, pero pueden vivir sin la presencia de hospederos si hay suficiente materia orgánica en descomposición (Duijn 1956).

Estos Oomycetes presentan el micelio muy ramificado y se desarrollan ampliamente notándose a simple vista como una masa algodonosa y blanquizca (Herrera y Ulloa 1998). Las hifas vegetativas son de dos clases: rizoidales pequeñas, que penetran al sustrato y permiten la fijación del micelio y la absorción de sustancias nutritivas, y las hifas externas que crecen fuera del sustrato, muy ramificadas y que constituyen la parte del micelio, en donde se forman los órganos de reproducción (Herrera y Ulloa 1998).

El ciclo de vida de *Saprolegnia* es descrito por Herrera y Ulloa (1998). Al efectuarse la reproducción asexual se desarrollan zoosporangios en las hifas externas. Posteriormente y a partir de la pared del zoosporangio, se forman zoosporas biflageladas. Estas al madurar, se escapan a través de un poro que se abre en la pared, situado en la región terminal del zoosporangio. Las zoosporas quedan libres en el agua y presenta diplanetismo. La zoosporas primarias son piriformes con dos flagelos en la parte anterior. Después de cierto tiempo en este estado, pierden sus flagelos, se inmovilizan o enquistan, segregan una pared delgada y constituyen quistes. Después de un corto tiempo la pared del quiste se rompe y se escapa una masa protoplásmica que forma una zoospora secundaria reniforme con dos flagelos implantados lateralmente, la que después de un periodo de natación vuelve a formar otro quiste, cuando este germina, desarrolla un nuevo micelio. En *Saprolegnia* se ha observado otro método de reproducción asexual, por medio de gemas o yemas, que se forman aisladas o en cadenas intercalares en ciertas partes o en las extremidades de las mismas. La reproducción sexual de los Oomycetes es oogámica (fecundación de una gameta femenina inmóvil por una gameta masculina móvil; la femenina es más grande (oosfera u óvulo) y se origina en el órgano femenino denominado oogonio; las gametas masculinas son más pequeñas (espermatozoides o anterozoides) y se producen en los órganos sexuales denominados anteridios), por contacto gametangial (gametangia) y la meiosis se lleva a cabo en los gametangios y no en el cigoto, por lo que los núcleos de las estructuras somáticas y de reproducción asexual, así lo de los gametangios jóvenes, son diploides (Fig. 4.4).

Cuando la infección por *Saprolegnia* ha ocurrido, en la piel de hospederos vivos, un primer micelio se formara, creciendo entre células de la epidermis penetrando desde ahí hasta la dermis y después debajo de los músculos (Duijn 1956). Mientras la hifa se esta formando esta crece no solo bajo la piel sino también a través de la piel y a través del músculo. Por la interacción de células en la piel, el músculo se empiezan a degenerar y eventualmente muere el hospedero (Duijn 1956). La infección puede dispersarse a través de cualquier contacto directo del crecimiento de hifas o por la colonización de zoosporas libres nadadoras (Wood y Willoughby 1986; Kiesecker y Blaustein 1997).

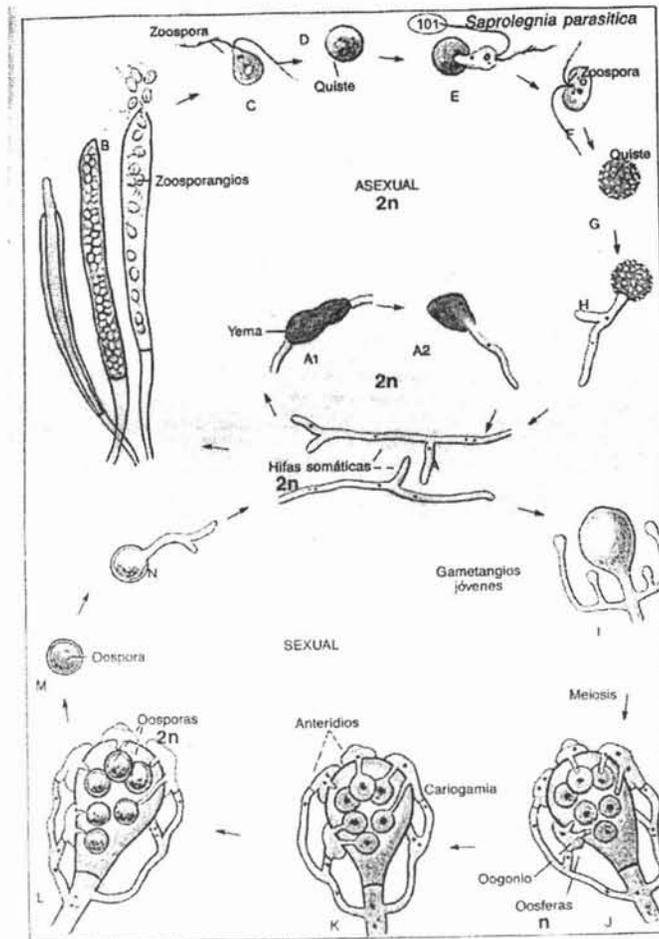


FIG 4.4 Ciclo de vida de *Saprolegnia* (Oomycetes). **A-H.** Fase de reproducción asexual, diploide, en la cual las hifas somáticas desarrolladas en el sustrato producen esporangios que liberan zoosporas piriformes; estas se enquistan y al germinar liberan zoosporas reniformes que también se enquistan. Al germinar los últimos quistes se forman las hifas somáticas, las cuales también pueden reproducirse por medio de yemas. **I-N.** Fase de reproducción sexual, que involucra la formación de oogonios y anteridios diploides, los cuales sufren meiosis antes de vincularse. La fertilización de las oosferas, haploides, se lleva a cabo por medio de núcleos gaméticos, haploides, que pasan a través de tubos emitidos por los anteridios y que penetran la pared de los oogonios. Las oosferas fertilizadas originan a las oosporas, diploides, las cuales son liberadas de los oogonios desintegrados y germinan para formar las hifas somáticas diploides. Tomado de Herrera y Ulloa. (1980)

Wood y Willoughby (1986) publican que la colonización sin infección muerta por *Saprolegnia* es inicialmente superficial, después es dermal. El micelio superficial aparentemente es fijado en el moco externo del hospedero, pero este eventualmente se extiende más allá y es presumiblemente sostenido por nutrientes filtrados a través del cadáver.

Cuando los hospederos son atacados por *Saprolegnia* es por que su resistencia ha sido debilitada por otras enfermedades, heridas o malas condiciones (Duijn 1956). En la naturaleza es posible que el efecto de patógenos, como *Saprolegnia*, puedan ser aumentados cuando el sistema de defensa es debilitado por estrés (Kiesecker y Blaustein 1995).

Se ha documentado como una fuente de estrés, la radiación UV-B, debilita el sistema de defensa a enfermedades (Kiesecker y Blaustein 1995) y también se ha observado que la susceptibilidad a la infección incrementa con el agua muy alcalina, ácida o con poco oxígeno (Wood y Willoughby 1986).

Una epidemia de *Saprolegnia ferax* debido al incremento de exposición a rayos UV-B ha sido identificado como causante de una alta mortalidad de embriones de anfibios en el Pacífico occidental de los Estados Unidos (Kiesecker *et al.* 2001). Otros estudios revelan que el clima inusual, y no la pérdida de la capa de ozono, es el agente principal a la exposición de rayos UV-B (Kiesecker *et al.* 2001). En años extremadamente secos una larga porción de sitios de puestas de huevos de sapos occidentales (*Bufo boreas*) se encuentran en aguas poco profundas, por lo que se sugiere que tiene menor protección contra los rayos UV-B (Pounds 2001). En aguas con menos de 20 cm de profundidad los filamentos de *Saprolegnia ferax* invaden y eliminan cerca del 80% de los embriones en promedio, en comparación al 12% en aguas con una profundidad de 50 cm (Pounds 2001). Finalmente Daszak *et al.* (2003) proponen que la Saprolegniosis es probablemente la causa más importante en la disminución de las poblaciones de anfibios.

### 1.3.DEFORMACIONES

En la década de los noventa se intensificaron los registros de extrañas malformaciones en más de 60 especies de ranas, sapos y salamandras en cuatro continentes (Blaustein *et al.* 2003). Como posibles causas se incluyen herbicidas, insecticidas, funguicidas, fertilizantes, coexistencia con ciertos peces, enfermedades, elevada densidad de renacuajos, temperaturas extremas, mecanismos hereditarios, contaminación radioactiva, retinoides, virus teratogénicos, metales, radiación UV-B (Sparling *et al.* 2000). El tipo de anomalía más frecuentemente registradas en el campo son aquellas de extremidades, principalmente de los miembros posteriores, las deformaciones incluyen pérdida total o parcial de miembros, miembros supernumerarios y un rango grande de anomalías en las extremidades inferiores (Johnson *et al.* 1999; Johnson *et al.* 2002; Stopper *et al.* 2002; Blaustein *et al.* 2003). Pruebas actuales señalan que la infección por el parásito tremátodo *Ribeiroia* es el responsable de estas anomalías (Johnson *et al.* 1999; Stopper *et al.* 2002; Blaustein y Johnson 2003; Jonson y Sutherland 2003).

Los tremátodos pertenecen al Phylum Platyhelminthes y son parásitos dependientes de ambientes acuáticos (Kiesecker *et al.* 2004). El tremátodo *Ribeiroia* tiene un ciclo de vida indirecto o multi-hospedero, en el cual la transmisión entre un segundo intermediario (peces, anfibios) y un hospedero final (aves, mamíferos) depende de la depredación (Johnson *et al.* 2002). Después de que un anfibio infectado es consumido por el hospedero final, el tremátodo madura sexualmente, liberando huevos junto con las heces del hospedero (Johnson *et al.* 2002). El primer hospedero intermediario en el ciclo de vida es un caracol acuático de los géneros *Planorbella*, *Biomphalaria* (Johnson *et al.* 2002), y *Helisoma* (Jonhson *et al.* 2003) el cual es infectado cuando los huevos eclosionan e invaden el tejido del caracol. Dentro del hospedero, el tremátodo se reproduce asexualmente produciendo un gran número de cercarias móviles (Johnson *et al.* 2002).

Después de transformarse en el interior del caracol en una segunda larva de vida libre, el parásito se introduce en los lugares donde se formaran las patas traseras de los renacuajos

(Blaustein y Johnson 2003). La cercaria de *Ribeiroia* preferentemente infecta y penetra el tejido alrededor de los miembros de las larvas de anfibios, causando inapropiadas formaciones o brotes de miembros en desarrollo (Johnson *et al.* 1999; Johnson *et al.* 2002) El genero *Ribeiroia* exhibe una única distribución en ranas infectadas: las metacercarias son altamente localizadas en el tejido alrededor del cinturón pélvico y miembros posteriores (Johnson *et al.* 1999). Se sospecha que el resultado de las malformaciones es aumentar la transmisión del trematodo, para limitar la habilidad del anfibio infectado de escapar a la depredación del hospedero final (Session y Ruth 1990; Johnson *et al.* 2002) (Fig. 4.5).

Se ha registrado que *Ribeiroia* está involucrada en el reciente incremento de anfibios deformes, esto podría ser debido a un incremento en la densidad o distribución de las especies hospederas (Johnson *et al.* 1999). Alternativamente, se sugiere que los cambios antropogénicos o naturales en el ambiente pueden causar que las poblaciones de caracoles aumenten (Johnson *et al.* 1999). También se ha descrito que la acelerada eutroficación debido a contaminantes orgánicos y la disminución de consumidores de moluscos, incrementan la abundancia de caracoles y consecuentemente la incidencia de la infección por el parásito (Johnson *et al.* 1999).

Radiación de tipo UV-B (280-315nm) es la radiación que produce los mayores daños significativos en la superficie terrestre (Blaustein *et al.* 2003b). Los organismos vivientes absorben la radiación UV-B eficientemente y puede ayudar a ocasionar mutaciones y muerte celular (Blaustein *et al.* 2003b). La radiación UV-B puede matar a anfibios directamente causando efectos subletales o actuando en conjunto con contaminantes, patógenos o con cambios climáticos afectándolos de manera adversa (Blaustein *et al.* 2003b). Muchos estudios han mostrado que con una alta incidencia de luz UV de una longitud de onda de <310nm puede afectar el desarrollo de los miembros posteriores y regeneración en salamandras, produciendo deficiencias en miembros y dígitos supernumerarios (Ankley *et al.* 1998).

#### 4.2.OBJETIVO

Identificar los agentes patógenos y alteraciones corporales encontradas en algunos individuos de la población de *Rana montezumae* en el Jardín Botánico de la REPSA.

#### 4.3 MATERIALES Y MÉTODO

##### 4.3.1 TRABAJO DE CAMPO

##### 4.3.1.1 CARACTERÍSTICAS DE LA ZONA

El trabajo se llevo a cabo en el Jardín Botánico de la REPSA (ver área de estudio).El estudio se realizó en 3 estanques por confirmarse la presencia de *Rana montezumae* y por las condiciones de mantenimiento.

En los muestreos realizados durante el estudio se tomaron notas de campo del estado general de los estanques estudiados. Se consideraron los siguientes datos: temperatura, profundidad, limpieza de basura, mantenimiento, bombeo de agua, biota existente.(Los datos y características de cada estanque se describieron en el capítulo 1).

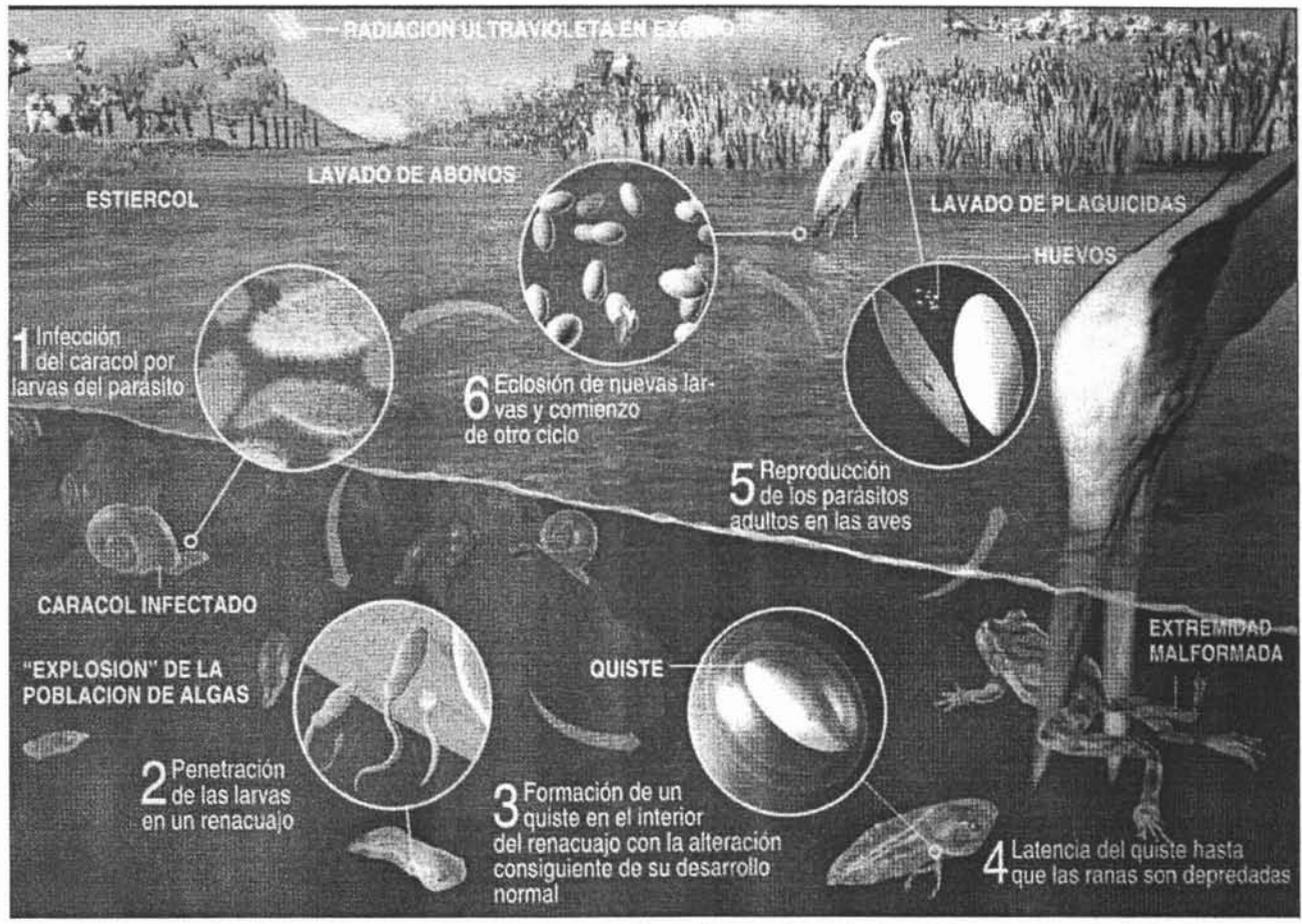


FIG. 4.5. Ciclo de Biológico del tremátodo *Ribeiroia ondatrae* le permite inducir malformaciones –incluida la formación de extremidades posteriores supernumerarias- en sucesivas generaciones de ranas Tomado de Blaustein y Jonhson (2003).

#### 4.3.1.2 COLECTA DE ESPECÍMENES

Durante el periodo comprendido entre Marzo del 2003 y Mayo del 2004, se realizaron muestreos 1 vez por semana en los 3 diferentes estanques. Estos muestreos comprendieron 59 días y 295 horas. Utilizando redes de cuchara, se capturaron organismos recién eclosionados, larvas, metamórficos y adultos. Cada larva y metamórfico capturado, le fue medido la longitud hocico-cloaca (LHC) y se determinó el estadio de desarrollo (GSD; Gosner 1960). A cada adulto encontrado, se le midió la Longitud Hocico Cloaca (LHC), y se le determinó el sexo. Todos los ejemplares fueron medidos en el lugar de captura y regresados a su estanque. En caso de encontrar especímenes muertos, agonizando, deformes y enfermos se llevaron al laboratorio para ser fijados. Los individuos fijados se preservaron en formol al 10%.

#### 4.3.2 TRABAJO DE LABORATORIO

Las partes bucales de las larvas de *Rana montezumae* colectadas y fijadas se observaron en el microscopio estereoscópico para determinar la presencia de alguna anomalía típica de larvas infectadas con *Batrachochytrium dendrobatidis* como son: asimetría en las hileras de dientes, porciones parciales o totales del disco oral blanquizas, inflamación anormal y enrojecimiento de las papilas.

##### 4.3.2.1 HISTOLOGÍA

Se realizó un análisis histológico de las partes bucales de dos renacuajos que presentaban estas anomalías en el disco oral en el laboratorio de Ecología y Conservación del Centro de Investigación en Recursos Bióticos CIRB, bajo la supervisión de la M. en C. Xóchitl Aguilar Miguel. Se realizó una disección del disco oral cortando el labio inferior y el labio superior en cada uno de los 2 ejemplares procesados. Los tejidos obtenidos de la disección se introdujeron a un frasco con agua para realizar un lavado, esto con una duración de 2 horas y con cambios de agua cada 30 minutos. Una vez lavado el tejido se proceso para deshidratarlo sometiéndolo a concentraciones graduales de etanol Xilol, (Apéndice 1). Posteriormente el tejido deshidratado se colocó en Xilol por 25 minutos. Transcurrido el tiempo el tejido se traspasó a paraplast por 30 minutos, parafina por 30 minutos y a parafina limpia por 30 minutos. Terminado este proceso el tejido se incluyó en parafina y se dejó secar 12 horas. Se hicieron cortes longitudinales de cinco micrómetros de grosor en un micrótopo. La tinción se realizó por medio de la técnica Hematoxilina Eosina. Apéndice 2.

##### 4.3.2.2 IDENTIFICACIÓN DEL MOHO ACUÁTICO

Una larva viva, dos metamórficos muertos y un adulto muerto de *Rana montezumae* que presentaban una masa algodonosa y blanquiza en alguna parte de su cuerpo o en su totalidad, fueron preservadas en formol al 10%. Antes de ser fijados una parte de la masa algodonosa y blanquiza fue puesta en agua destilada esterilizada para cultivo e identificación. El cultivo e identificación de los organismos fue realizada por la Dra. Guadalupe Vidal en el laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

##### 4.3.2.3 DISECCIÓN

Solo una de las larvas capturadas presentó miembros supernumerarios, a esta se le practicó un examen helmintológico, que consistió en una revisión de la superficie del cuerpo, de las cavidades y búsqueda intramuscular bajo el microscopio estereoscópico.

#### 4.4.RESULTADOS

##### 4.4.1.RESULTADOS GLOBALES

Durante los 14 meses de estudio se capturaron un total de 1225 eclosionados, 1435 larvas, 58 metamórficos y 53 post-metamórficos y adultos. Un total de 23 larvas (1.60%), 5 metamórficos (8.6%) y 1 adulto (1.88%) presentaron alguna anomalía (Fig.4.6).De veintidós larvas (1.46%) presentaron anomalías en el disco oral, una larva (0.07%) presentaron extremidades supernumerarias, una larva (0.07%) se encontró con Saprolegnia. Cinco metamórficos (5.1%) se encontraron muertos sin causa aparente, cinco metamórficos (5.1%) presentaron saprolegnia. Del total de adultos uno (1.88%) presentó Saprolegnia.

Tabla 4.2.

TABLA 4.2. Porcentaje del número total de individuos de *Rana montezumae* encontrados por categoría de edades con alguna anomalía.

Categoría de edades	% de individuos	Anomalía y sintomatología
Larva	1.53%	Disco oral
Larva	0.06968%	Saprolegnia
Larva	0.06968%	Extremidad supernumeraria
Metamórficos	5.1%	Saprolegnia
Metamórficos	5.1%	Muerte sin causa aparente
Adulto	1.88%	Saprolegnia

##### 4.4.2. RESULTADOS POR ESTANQUE

###### Estanque #1

Un total de 137 eclosionados, 565 larvas, 50 metamórficos, 26 post-metamórficos y adultos, fueron capturados y medidos. De las 565 larvas una presentó el aparato oral sangrando con pérdida del labio anterior y vaina mandibular superior, con vaina mandibular inferior de color blanco; tres presentaron hinchamiento en las papilas; una presentó extremidad posterior derecha supernumeraria. De los 50 metamórficos dos se encontraron muertos y secos fuera del estanque. Los organismos que no presentaron alguna anomalía fueron regresados al estanque. Tabla 4.3.

###### Estanque #2

En este estanque se capturaron y midieron un total de 929 eclosionados, 132 larvas, 2 metamórficos, 9 post-metamórficos y adultos. De las 132 larvas, 3 presentaron las hileras de dientes y vainas mandibulares con porciones blanquizas. De los dos metamórficos uno se encontró seco fuera del estanque. Tabla 4.3.

###### Estanque #3

Un total de 159 eclosionados, 738 larvas, 6 metamórficos, 18 post-metamórficos y adultos fueron capturados y medidos. De las 738 larvas 15 presentaron anomalías en el disco oral que incluyen hileras de dientes y vainas mandibulares con porciones blanquizas. Las hileras de dientes asimétricas bilateralmente, y las papilas enrojecidas. Una presentó la extremidad posterior izquierda cubierta por una masa blanca filamentosa. De los 6 metamórficos 2 se hallaron muertos con parte de su masa corporal cubierta por una masa blanca filamentosa. De los 18 post-metamórficos y adultos solo un adulto muerto fue localizado con parte de su masa corporal cubierta por una masa blanca filamentosa. Tabla 4.3.

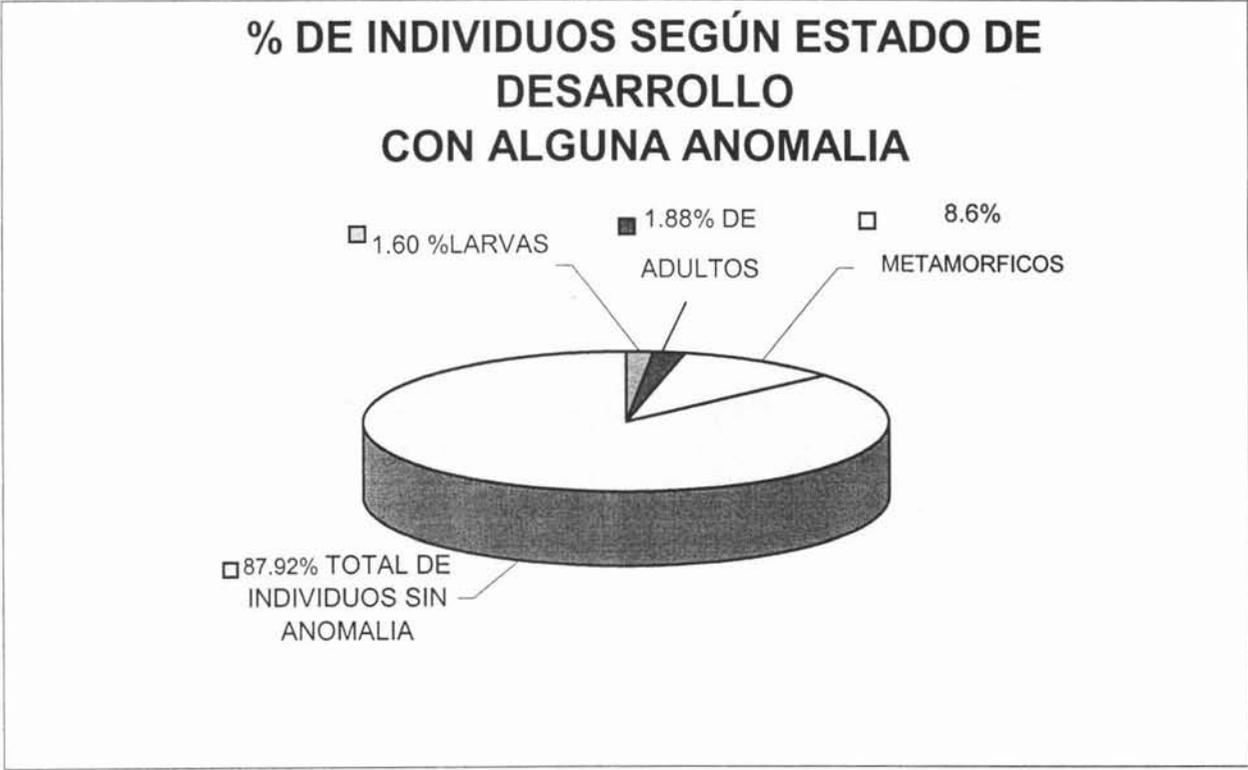


FIG. 4.6. Porcentaje de individuos de *Rana montezumae* por categoría de edades que presentaron alguna anomalía.

TABLA 4.3 Total de individuos encontrados con alguna anomalía en los tres estanques estudiados. Estanque #, Estado de desarrollo, longitud Hocico-cloaca / longitud total, encontrado en campo y anomalía observada.

1	45	/49.4	Vivo	Carencia de ojo izquierdo
1	36	26.8 / 88.8	Vivo	Al capturar el organismo se observaba que el aparato oral sangraba. Carente de labio anterior y vaina mandibular superior . Vaina mandibular inferior de color blanco.
1	26	19.1/45.9	Vivo	Hilera de dientes asimetría e hinchada
1	27	19.3/56.5	Vivo	Hilera de dientes asimétrica y labio superior hinchado
1	39	39.7/***	Vivo	Miembro posterior derecho supernumerario. presencia de un fémur mas
1	44	35.3/49.5	Muerto	Encontrado seco muerto fuera del estanque.
1	45	40.1/42.9	Muerto	Encontrado seco muerto fuera del estanque
2	46	/31.2	Muerto	Encontrado seco muerto fuera del estanque
2	31	25/40	Vivo	Hileras de dientes y vainas mandibulares con porciones blanquizas
2	32	20.5/53.2	Vivo	Hileras de dientes y vainas mandibulares con porciones blanquizas
2	31	21.2/55.8	Vivo	Hileras de dientes y vainas mandibulares con porciones blanquizas
	37	32.7/103.5	Vivo	Al ser capturado se observaba en el organismo que el aparato oral sangraba, no se observa labio posterior ni vaina mandibular posterior
3	26	17.9/46.9	Vivo	Hilera de dientes asimétricas
3	26	17/40.9	Vivo	Hilera de dientes asimétricas
3	26	21.5/48.9	Vivo	Hilera de dientes asimétricas
3	26	15.4/36.7	Vivo	Hilera de dientes asimétricas y papilas hinchadas
3	26	21.4/50.6	Vivo	Hilera de dientes asimétricas y papilas hinchadas
3	26	21.5/54.3	Vivo	Hilera de dientes asimétricas
3	26	18.2/47.2	Vivo	Papilas hinchadas
3	26	18.3/45.7	Vivo	Hilera de dientes asimétricas
3	26	16.9/30.8	Vivo	Hilera de dientes asimétricas
3	26	23.4/36.7	Vivo	Papilas hinchadas, pérdida de partes bucales
3	26	20/52.2	Vivo	Papilas hinchadas, pérdida de partes bucales
3	36	32.7/88.3	Vivo	Hilera de dientes asimétricas
3	37	32.6/87	Vivo	Hilera de dientes asimétricas
3	38	38.4/106.9	Vivo	Hileras de dientes y vainas mandibulares con porciones blanquizas
3	37	31.2/90.8	Vivo	Extremidad posterior izquierda envuelta en masa blanca algodonosa
3	45	/34.3	Muerto	Masa corporal en su parte dorsal y ventral cubierta por una masa blanca algodonosa
3	45	/	Muerto	Costado derecho del organismo cubierto por una masa blanca algodonosa
3	46	/65	Muerto	Parte dorsal y ventral cubierta por una masa blanca algodonosa

#### 4.4.3. QUITRIDOMICOSIS: ESTUDIO HISTOLÓGICO.

Se observaron un total de 35 cortes histológicos por cada disección realizada al disco oral de los individuos procesados. En ningún corte se observó al quitridio *Batrachochytrium dendrobatidis*. La boca de las ranas muestran un epitelio de varias capas con una capa basal compuesta por algunas células redondeadas, después varias capas de células cuboidales (Warren 1959) (Fig. 4.7). El núcleo de las células epiteliales generalmente contiene cuatro a seis nucléolos cada uno (Warren 1959). En los cortes realizados no se observaron las hileras de dientes de las larvas, esto debido a la carencia o falta de partes del disco oral que presentaron los individuos colectados. Por lo general las partes bucales como hileras de dientes encontradas en cortes histológicos de larvas son de color café y se observan en hilera (Fig.4.3).

Puschendorf (2004) menciona que en las muestras histológicas de anfibios infectados por quitridiomycosis se observa la primera capa de la epidermis desprendiéndose, probablemente como una defensa de los animales infectados para deshacerse del patógeno y evitar que se introduzca a otras áreas de la epidermis. En el presente trabajo los cortes histológicos mostraron poco desprendimiento de la superficie queratinizada de la epidermis (Fig.4.7).

Berger *et al.* (1999b) señalan que la histopatología de quitridiomycosis está asociada con una hiperqueratosis focal y erosión en el *Stratum corneum*. Los cortes de este estudio no presentaron esta patología (Fig.4.7).

#### 4.4.4 IDENTIFICACION DE MOHOS ACUÁTICOS

Los resultados obtenidos para la identificación del hongo fueron otorgados por la Dra. Vidal del la Facultad de Ciencias en la UNAM.

En una larva viva, 1 metamórfico muerto y un adulto muerto se encontró micelio identificado como *Saprolegnia spp.* La masa blanca algodonosa presente en el cuerpo de 1 metamórfico encontrado muerto fue identificado como *Saprolegnia ferax*.

Las características diagnósticas para la identificación taxonómica del omicete *Saprolegnia ferax* fueron la presencia de zoosporas dispuestas en hilera dentro del esporangio, el cual se renueva internamente del ya existente dejando restos de la pared del anterior. Presentó micelo aseptado y solo se observó la formación de septos en la base de las estructuras reproductoras (asexuales o sexuales). Los esporangios fueron cilíndricos y las hifas terminales que funcionan como esporangióforos terminaban en una abertura.

Las medidas promedio de 20 estructuras reproductoras asexuales de *Saprolegnia ferax* encontradas en un metamórfico de *Rana montezumae* son 20.5  $\mu\text{m}$  de ancho y 60 $\mu\text{m}$  de longitud del esporangio (Fig.4.8) 7 $\mu\text{m}$  de ancho y 5  $\mu\text{m}$  de longitud de la espora (Fig.4.9), y las medidas promedio de 3 estructuras sexuales son 10  $\mu\text{m}$  de ancho del anteridio, 40 $\mu\text{m}$  de diámetro del oogonio y 10 $\mu\text{m}$  de diámetro de la oospora (Fig.4.10)

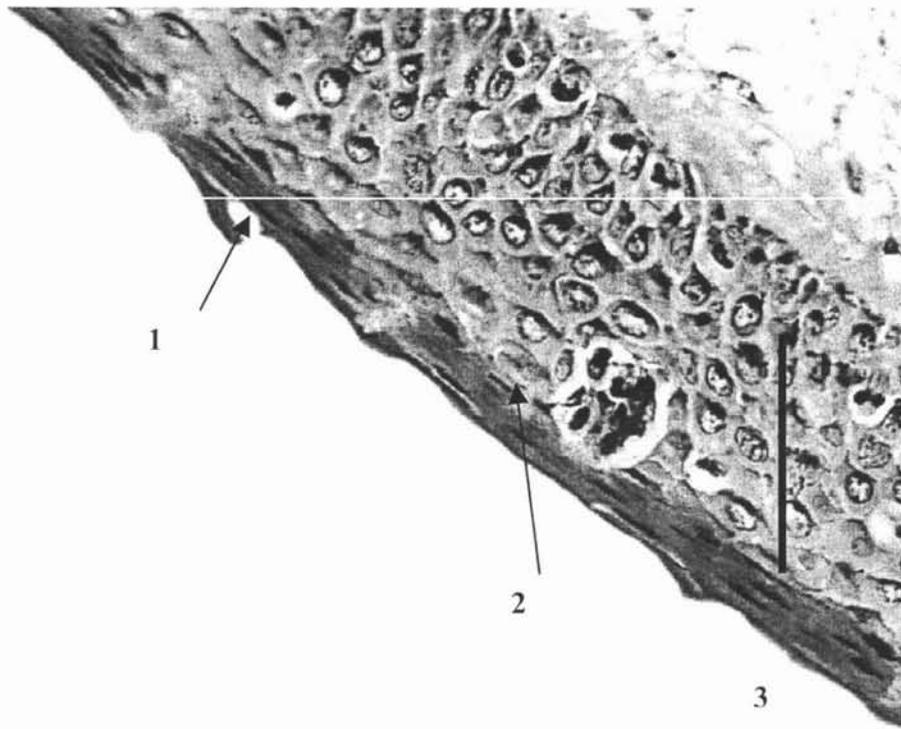


FIG. 4.7 Corte histológico realizado en el disco oral a una larva de *Rana montezumae* donde se observa desprendimiento de la superficie queratinizada de la epidermis (1). El *Stratum corneum* no tiene erosión (2) y la epidermis no muestra inflamación (3). Muestras típicas de desprendimiento de epidermis, erosión del *Stratum corneum* e inflamación de la epidermis observar Fig.4.1 y 4.2.

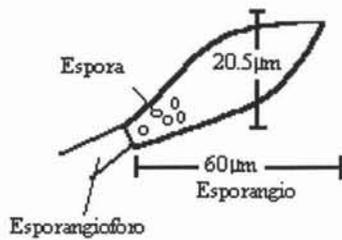


FIG.4.8 El promedio de las medidas realizadas a 20 estructuras asexuales de *Saprolegnia ferax*. Se puede observar el Esporangioforo, Esporangio y Espora

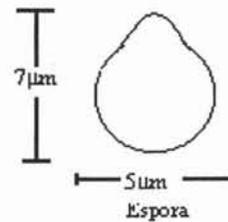


FIG.4.9 El promedio de medidas realizadas a 20 esporas.

#### Fase sexual

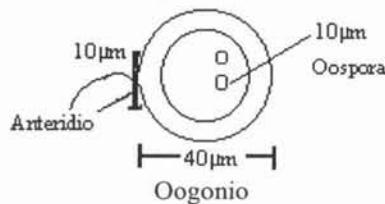


FIG4.10 Oogonio terminal, con Anteridios simples, rodeando al Oogonio. Promedio de medidas realizadas a 3 estructuras sexuales de *Saprolegnia ferax*.

#### 4.4.5 EXAMEN HELMINTOLÓGICO

El procedimiento realizado para buscar metacercarias de *Ribeiroia* sp en el ejemplar con extremidad supernumeraria, no arrojaron evidencia de parásitos.

#### 4.5 DISCUSIÓN

*Rana montezumae* fue la única especie de anfibio encontrado en los estanques estudiados en el Jardín Botánico de la REPSA. Se tiene el reporte de su existencia en este sitio desde 1994 (Ejemplar depositado en la Colección Nacional de Anfibios y Reptiles del Instituto de Biología de la UNAM). Ningún trabajo anterior a este se había realizado para estudiar al anfibio.

##### 4.5.1 QUITRIDOMICOSIS

Quitridiomicosis es una enfermedad que puede estar relacionada con la muerte masiva de anfibios en centro y Sudamérica (Blaustein y Kiesecker 2002). En varios estados de la República Mexicana se ha encontrado la sintomatología de la enfermedad (Lips *et al.* 2004; Tabla 1). La sintomatología oral causada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* en larvas incluyen la pérdida de las partes bucales, asimetría bilateral en la hilera de dientes, porciones del disco oral blanquizas y papilas hinchadas y rojas, fueron encontradas en renacuajos de *Rana montezumae* (Figs. 4.11, 4.12, 4.13).

Renacuajos saludables pueden presentar el hongo quitridial por meses y prevalecer en la población (Berger *et al.* 1999b). Las larvas capturadas en este estudio con la sintomatología de quitridiomycosis se encontraban con un buen aspecto, con una buena coloración, y con una alta actividad. Algunos post-metamórficos de *Rana montezumae* se encontraron muertos alrededor de los estanques siguiendo el posible patrón de resistencia de larvas al hongo y la muerte posterior a la metamorfosis, pero no se puede asegurar que murieron por estar infectados por quitridiomycosis, estudios histológicos posteriores podrían aclarar esta interrogante.

Los estudios histológicos de cortes transversales de partes bucales realizados para confirmar la presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en 2 larvas de *Rana montezumae* con anomalías en el disco oral fueron negativos, ya que no se encontró el patógeno en las muestras procesadas. Si presentan las larvas la sintomatología típica de la enfermedad ¿Por qué no se encontró el patógeno en las muestras? Puschendorf (2004), argumenta las posibles causas de la obtención de un negativo falso en cortes histológicos para determinar quitridiomycosis en anfibios. Menciona la posibilidad de no haber usado una cantidad suficiente de formol en el momento de fijar la muestra, o encontrarse con el caso de una ligera infección donde la primera capa de piel en la que se encontraban los esporangios se haya desprendido antes de realizar la prueba histológica y por último no haber absorbido la tinción, sin embargo las muestras y las capas de tejidos parecen normales y totalmente constituidas (Fig. 4.7).

#### 4.5.2 SAPROLEGNIOSIS

*Saprolegnia ferax* es conocido como un patógeno de anfibios causante de una alta mortalidad de embriones (Kiesecker *et al.* 2001). Cuando la infección ha ocurrido en la piel de hospederos, un micelio será formado (Duijn 1959). La presencia de micelio como una masa blanca filamentososa en anfibios capturados vivos y muertos se presentó en las larvas de *Rana montezumae* del estanque #3 (Fig. 4.14, 4.15) Duijn (1959) menciona que cuando los hospederos son atacados por *Saprolegnia* es por que su resistencia ha sido debilitada por otras enfermedades, heridas o malas condiciones; las características del estanque #3 como el poco mantenimiento dado, la falta de oxigenación y movimiento del agua, la repentina limpieza realizada con cloro y detergente, así como la presencia de agentes tóxicos en el ambiente como pilas oxidadas en su interior hacen de este sitio un ambiente estresante para los anfibios siendo estos más propensos a adquirir *Saprolegnia* ya que como se menciona es el único estanque donde se encontró la enfermedad.

La mayoría de las especies de *Saprolegnia* viven como sapróbias acuáticas y algunas son parásitas (Herrera y Ulloa 1998), pero no son parásitos obligados, pueden vivir muy bien sin la presencia de hospederos si hay suficiente materia orgánica como plantas en descomposición (Duijn 1956). Por ello no podemos argumentar que los anfibios encontrados muertos con micelio superficial de *Saprolegnia* sp en la epidermis, hallan muerto por saprolegniosis, ya que la presencia excesiva de algas filamentosas (*Spirogyra* sp) y plantas en descomposición (*Nymphaea* sp) podría haber sido el alimento de *Saprolegnia* y después podría haber ocurrido la colonización superficial del micelio alimentado por cadáver y después posiblemente ocurrió la colonización dermal como es descrito por Wood y Willoughby (1986).

Pounds (2001) menciona que en aguas con menos de 20 cm de profundidad los filamentos de *Saprolegnia ferax* invaden y matan cerca del 80% de los embriones en comparación a las aguas con una profundidad del 50 cm, donde el moho acuático mata en promedio el 12% de los embriones. En un metamórfo vivo se encontró la presencia de *Saprolegnia ferax*; las puestas observadas en el mismo sitio no estaban parasitadas por el omicete. Se sugiere un seguimiento de las futuras puestas de huevos de *Rana montezumae* para observar si estas son parasitadas con *Saprolegnia spp* y *Saprolegnia ferax* ya que las masas son depositadas a menos de 15 cm de la superficie entre plantas o relieves en los estanques.

#### 4.5.3 DEFORMACIONES

A la fecha un total de 67 especies de anuros y 26 salamandras se han documentado con deformaciones (Sparling *et al.* 2000). Este es el primer trabajo que muestra a *Rana montezumae* con deformaciones (Fig. 4.16). Existen argumentos para poder relacionar la extremidad supernumeraria encontrada en una larva con la presencia de trematodos de *Ribeiroia*, a pesar de que no se encontró evidencia de infección. El Jardín Botánico de la REPSA es un sitio de albergue de garzas migratorias, se ha observado la presencia de la garza *Butorides virescens*. Al igual que en los estanques estudiados se encuentran caracoles del género *Planorbella* y una gran cantidad de algas filamentosas. Estudios posteriores realizados con los caracoles del género *Planorbella*, podrían verificar esta hipótesis. Otras posibles causas e hipótesis de la malformación podrían ser respondidas en un futuro con estudios de calidad del agua, radiación UV-B, metales pesados, genética, conducta.

El estatus poblacional de *Rana montezumae* en el Jardín Botánico de la REPSA es crítico, el estrés ambiental al que están sometidas como el cambio repentino de agua, las enfermedades encontradas, el saqueo de metamórficas de su hábitat para mascotas por los visitantes, y el vaciado para limpieza de los estanques con huevos y larvas perturba la dinámica poblacional del anfibio. El porcentaje de anfibios encontrados con alguna enfermedad y deformación en este estudio es bajo (Fig. 4.6) pero la cantidad de anomalías halladas en éstos llama la atención. La intención de este estudio fue determinar los posibles patógenos encontrados en la población de *Rana montezumae* utilizando las técnicas convencionales de otros estudios a nivel mundial para determinar y diagnosticar enfermedades. Estudios a futuro podrían verificar como el medio esta afectando a la población de *Rana montezumae* y así entender algunas de las causas de enfermedades y deformaciones en anfibio.

Algunas propuestas para mejorar el hábitat de *Rana montezumae* en el Jardín Botánico:

- Buen manejo de los estanques que incluye movimiento continuo de agua, limpieza de basura .
- Extracción continua de algas filamentosas
- Cuando los estanques sean vaciados colocar los huevos y larvas en cubetas y una vez que sean llenados depositar los organismo dentro.
- Evitar el saqueo de ranas metamórficas o la introducción de especies ajenas como tortugas.
- Realizar un tríptico con información sobre las especies encontradas en el Jardín Botánico y su importancia.

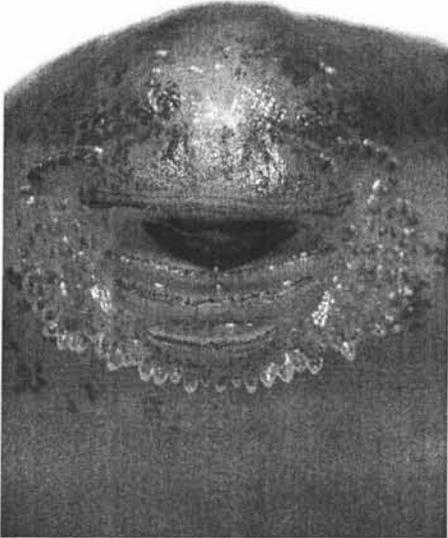


Fig. 4.11. Foto del disco oral de *Rana montezumae* del Jardín Botánico de la REPSA.

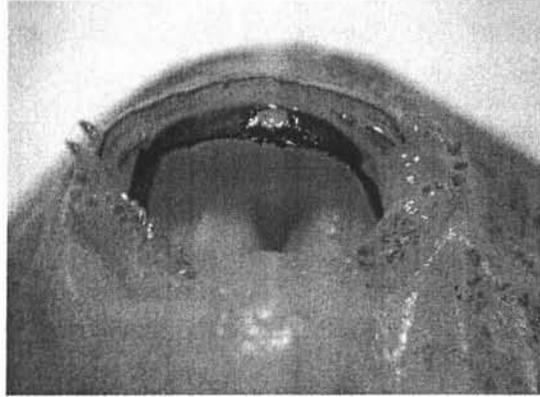


Fig. 4.12. Foto del disco oral de *Rana montezumae* de los estanques del Jardín Botánico de la REPSA, con la sintomatología típica de quitridiomycosis. Se puede observar la pérdida de las hileras de dientes inferiores y la vaina mandibular superior con una porción blanquizca

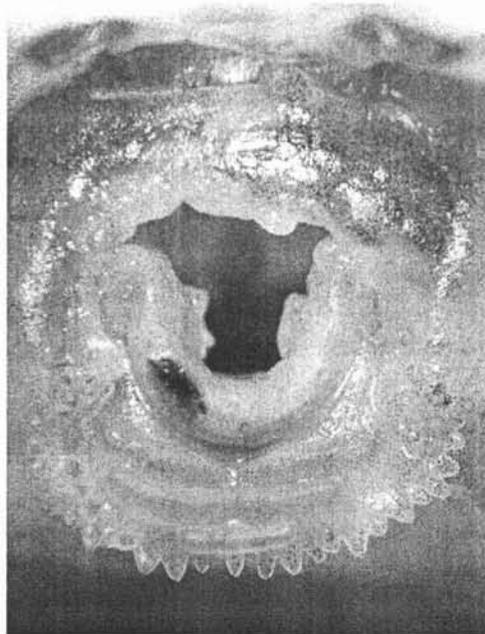


Fig. 4.13. Foto del disco oral de *Rana montezumae* del Jardín Botánico de la REPSA con la sintomatología típica de quitridiomycosis. Se observa la pérdida de la vaina mandibular superior y las hileras de dientes superiores. La vaina mandibular inferior casi en su totalidad blanquizca.

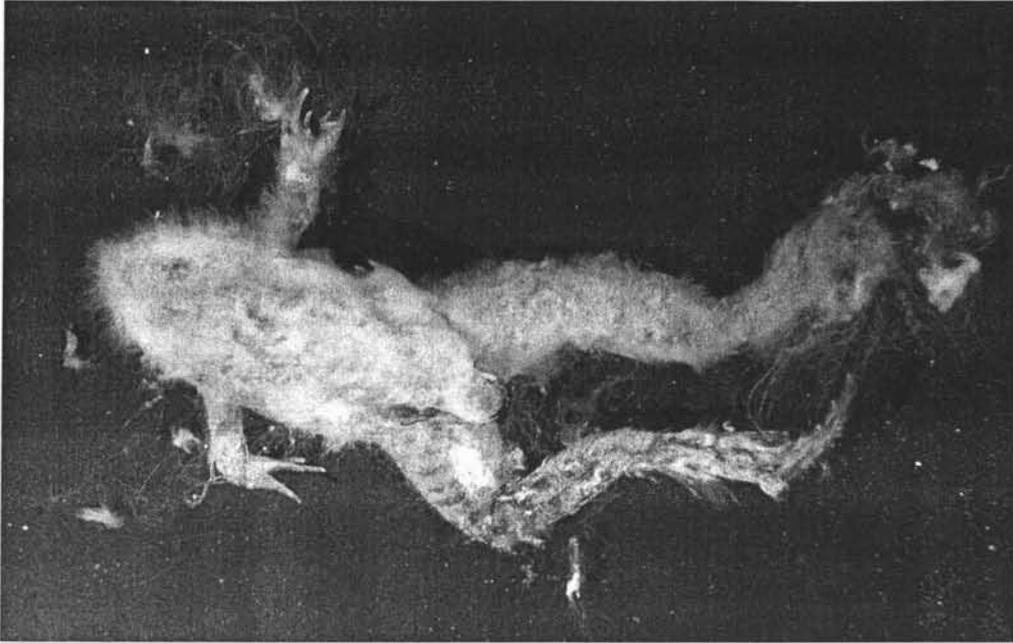


Fig. 4.14. Foto de un metamórfico de *Rana montezumae* del Jardín Botánico de la REPSA. Encontrado muerto con *Saprolegnia* spp.

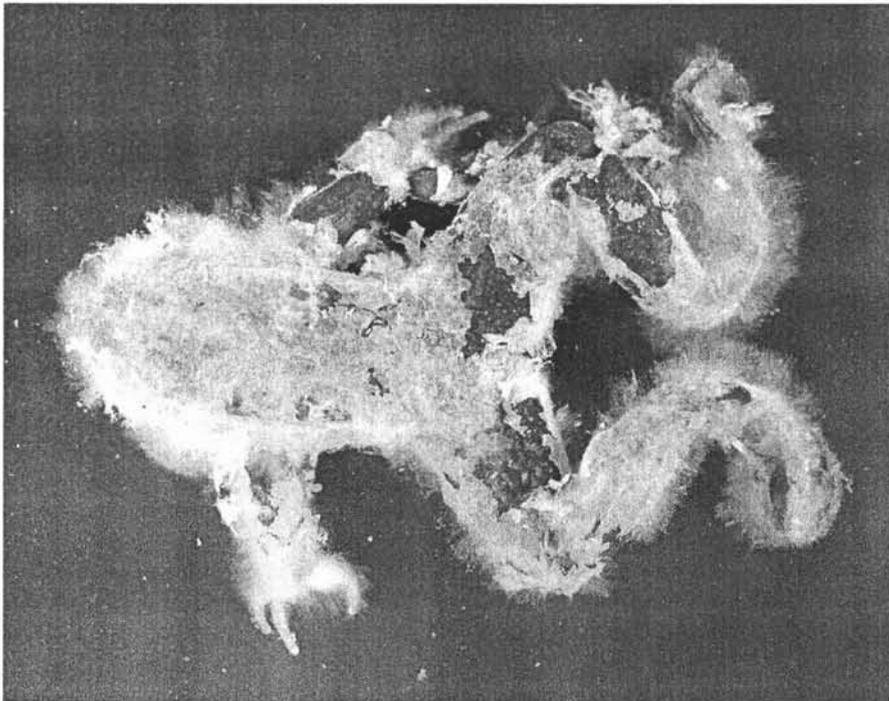


Fig. 4.15 Foto de un adulto de *Rana montezumae* del Jardín Botánico de la REPSA. Encontrado muerto con *Saprolegnia* spp.

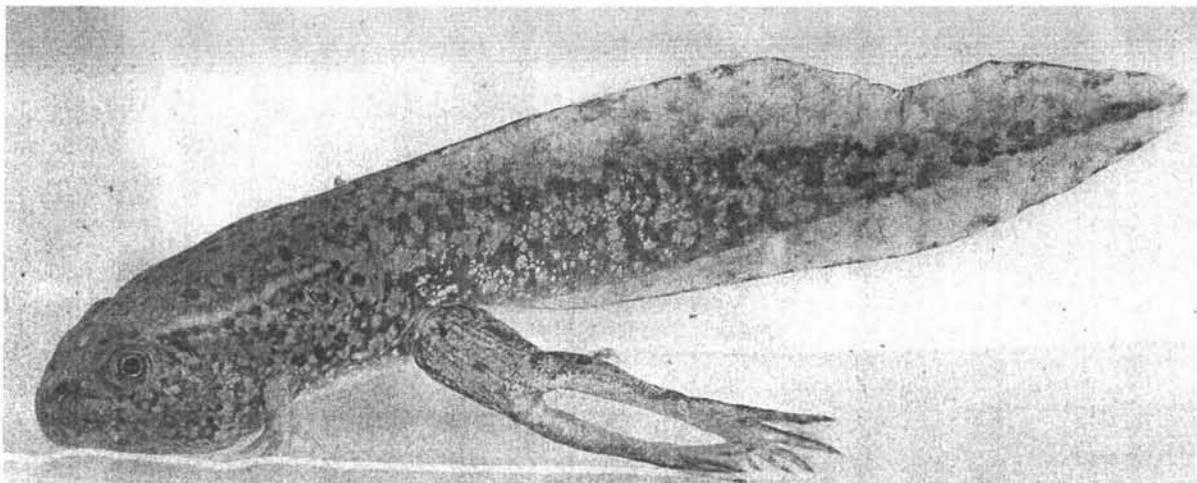


Fig. 4.16. *Rana montezumae* encontrada en el Jardín Botánico de la REPSA, con extremidades supernumerarias

#### 4.6 BIBLIOGRAFÍA:

Ankley G.T., J.E. Tietge, D.L. DeFoe, K.M. Jensen, G.W. Holcombe, E.J. Durhan, S.A. Diamond. (1998) Effects of Ultraviolet light and methoprene on survival and development of *Rana pipiens*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **17**, 2530-2542.

AmphibiaWeb: Information on amphibian biology and conservation (web application). 2005. Berkeley, California: AmphibiaWeb. Available: <http://amphibiaweb.org/>. (Accessed: 2005).

Barton D.P., y S.P. Richards. (1996) Helminth infracommunities in *Litoria genimaculata* from Birthday Creek, an upland rainforest stream in northern Queensland, Australia. *International Journal for Parasitology*. **26**:1381-1385.

Berger L, R. Speare, P. Daszak, D.E. Green, A.A. Cunningham, L. Goggin, R. Slocombe, M.A. Ragan, A.D. Hyatt, K.R. McDonald, H.B. Hines, K.R. Lips, G. Marantelli, H. Parkes. (1998) Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **95**, 9031-9036.

Berger L, R. Speare, A.D. Hyatt. Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. In: Campbell A. (ed) *Declines and disappearances of Australian frogs*. Environment Australia: Canberra. 1999: 23-33.

Berger L, R. Speare R, A. Kent. Diagnosis of chytridiomycosis in amphibians by histologic examination. (1999b) World Wide Web file, <http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/histo/chhisto.htm>, 20 November 1999.

Blaustein A.R., y J.M. Kiesecker. (2002) Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecology letters*, **5**, 597-608.

Blaustein A.R., y P.T. Johnson. (2003) Malformaciones en anfibios. *Investigación y Ciencia*, **319**, 46-52.

Blaustein A.R., J.M. Romansic, J.M. Kiesecker, A.C. Hatch. (2003b) Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Diversity and Distributions*, **9**, 123-140.

Bosch J, I. Martínez-Solano, M. García-París. (2001) Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. *Biological Conservation*, **97**, 331-337.

Bradley G.A., P.C. Rosen, M.J. Sredl, T.R. Jones, J.E. Longcore. (2002) Chytridiomycosis in native Arizona frogs. *Journal of Wildlife Diseases*, **38**, 206-212.

Bragg A.N., y W.N. Bragg. (1958) Parasitism of spadefoot tadpoles by *Saprolegnia*. *Herpetologica*, **14**, 34.

Collins J.P., y A. Storfer . (2003) Global amphibian declines: storing the hypotheses. *Diversity and Distributions*, **9**, 89-98.

Cunningham A.A., T.E.S. Langton, P.M. Bennett, J.F. Lewin, S.E.N. Drury, R.E. Gough, S.K. MacGregor. (1996) Pathological and microbiological Findings from incidents of unusual mortality of the common frog (*Rana temporaria*). *Phil. Trans. R. Lond. B.*, **351**, 1539-1557.

Daszak P, L. Berger, A.A. Cunningham, A.D. Hyatt, D.E. Green, R. Speare. (1999) Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerging Infectious Diseases*, **5**, 735-748.

Daszak P, A.A. Cunningham, A.D. Hyatt. (2003) Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity and Distributions*, **9**, 141-150.

Duijn Jnr. C. Van.(1956) Diseases of fishes. Water life Dorser House, Stamford Street, London S.E.1. 1956.

Fellers G.M., D.E. Green, J.E. Longcore. (2001) Oral chytridiomycosis in the Mountain Yellow-Legged frog. *Copeia*, **4**, 945-953.

Groff J.M., A. Mughannam, T.S. McDowell, A. Wong, M.J. Dykstra, F.L. Frye, R.P.Hedrick. (1991) An epizootic of cutaneous zygomycosis in cultured dwarf African clawed frogs (*Hymenochirus curtipes*) due to *Basidiobolus ranarum*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, **29**, 215-223.

Herrera T., y M. Ulloa. (1998) El reino de los hongos : Micología básica y aplicada. UNAM. Fondo de Cultura Económica.

Johnson P.T., K.B. Lunde, E.G. Ritchie, A.E. Launer. (1999) The effect of Trematode infection on Amphibian Limb Development and Survivorship. *Science*, **284**, 802-804.

Johnson T.J., K.B. Lunde, E.M. Thurman, E.G. Ritchie, S.N. Wray, D.R. Sutherland, J.M. Kapfer, T.J. Frest, J. Bowerman, A.R. Blaustein. (2002) Parasite (*Ribeiroia Ondatrae*) infection linked to amphibian malformations in the western United States. *Ecological Monographs*, **72**, 151-168.

Johnson T.J., y D.R. Sutherland. (2003) Amphibian deformities and *Ribeiroia* infection: an emergin helminthiasis. *Trends in Parasitology*, **19**, 332-335.

Kiesecker J.M., y A.R. Blaustein. (1995) Synergism between UV-B radiation and a pathogen magnifies amphibian embryo mortality in nature. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. **92**, 11049-11052.

Kiesecker J.M., y A.R. Blaustein. (1997) Influences of egg laying Behavior on pathogenic infection of amphibian eggs. *Conservation Biology*, **11**, 214-220.

- Kiesecker J.M., y A.R. Blaustein. (1999) Pathogen reverses competition between larval amphibians. *Ecology*, **80**, 2442-2448.
- Kiesecker J.M., A.R. Blaustein, L.K. Belden. (2001) Complex causes of amphibian population declines. *Nature*, **410**, 681-684.
- Kiesecker J.M., A.R. Blaustein, C.L. Millern. (2001b) Transsfer of Pathogen from fish to amphibians. *Conservation Biology*, **15**,1064-1070.
- Kiesecker J.M., L.K. Belden, K. Shea, M.J. Rubbo. (2004) Amphibian Decline and emergin diseases. *American Scientist*, **92**, 138-147.
- Lips K.R. (1999) Mass mortality and population declines of anurans at an upland site in western Panama. *Conservation Biology*, **13**, 117-125.
- Lips K.R., J.R. Mendelson III, A. Muñoz-Alonso, L. Canseco-Marquez, D.G. Mulcahy. (2004) Amphibian population declines in montane southern México: resurveys of historical localities. *Biological Conservation*, **119**, 555-564.
- Longcore J.E., A.P. Pessier, D.K. Nichols. (1999) *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, **92**, 219—227.
- Miller E.A., R.J. Montali, E.C. Ramsay, B.A. Rideout. (1992) Disseminated chromoblastomycosis in a colony of ornate horned frogs (*Ceratophrys ornata*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **23**,433-438.
- Muths E., P. Stephen-Corn, A.P. Pessier, D. Earl-Green. (2003) Evidences for disease-related amphibian decline in Colorado. *Biological Conservation*, **110**, 357-365.
- Parra-Olea G., M. García París, D.B. Wake.(1999) Status of some populations of Mexican salamanders (Amphibia:Plethodontidae). *Rev. Biol. Trop.*, **47**,217-223.
- Piotrowski J.S., S.L. Annis, J.E. Longcore. (2004) Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*, **96**, 9-15.
- Pounds J.A. (2001) Climate and amphibian declines. *Nature*, **410**, 639-640.
- Puschendor R.(2004) Guía práctica para el diagnóstico de quitridiomycosis en anfibios utilizando diferentes técnicas. Apoyado por el Pan-American Studies Institute, un programa cofinanciado por la US National Science Foundation y el Us Department of Energy.
- Rollins-Smith L., L.K. Reinert, V. Miera, J.M. Conlon. (2002) Antimicrobial peptide defenses of the Tarahumara frog, *Rana tarahumarae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **297**,361-367.
- Santos-Barrera G.(2004) Enfermedades infecciosas en poblaciones de anfibios. *Biodiversitas*, **56**,1-6.

Session S.K., S.B. Ruth. (1990) Explanation for naturally occurring supernumary limbs in amphibians. *Journal of Experimental Zoology*, **254**,38-47.

Sparlin D.W., G. Linder, C.A. Bishop. Ecotoxicology of amphibians and reptiles. A Technical Publication of SETAC. USA (2000). 877 pp.

Stopper G.F., L. Hecker, R.A. Franssen, S.K. Sessions. (2002) How Trematodes Cause Limb Deformities in Amphibians. *Journal of Experimental Zoology (Mol dev evol)*, **294**,252-263.

Wake E.O. (1991)Declining amphibian populations. *Science*, **253**,860.

Warren Andrew. (1959) Textbook of comparative histology. Oxford University Press. 652 pp.

Wood S.E., y L.G. Willoughby. (1986) Ecological observations on the fungal colonization of fish by saprolegniaceae in Windermere. *Journal of Applied Ecology*, **23**,737-749.

Young B., J. Lips, R. Reaser, A. Ibáñez, R. Salas, L Cedeño, S. Coloma, E. Ron, J. LaMarca, A. Meyer, F. Muñoz, G. Bolaños, G. Chavez, D. Romo. (2001) Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin America. *Conservation Biology*, **15**, 1213-1223.

## APÉNDICE 1

### Proceso de deshidratación

Alcohol 30%	30 minutos
Alcohol 50%	30 minutos
Alcohol 70%	30 minutos
Alcohol 80%	30 minutos
Alcohol 96%	30 minutos
Alcohol 100%	30 minutos

## APÉNDICE 2

### Tinción Hematoxilina-Eosina

Xilol	15 minutos
Alcohol absoluto	5 minutos
Alcohol al 96 %	5 minutos
Alcohol al 96%	5 minutos
Alcohol al 96%	5 minutos
Alcohol al 80%	5 minutos
Alcohol al 70%	5 minutos
Alcohol al 50%	5 minutos
Agua	5 minutos
Agua destilada	5 minutos
Hematoxilina	5 minutos
Agua destilada	5 minutos
Agua	5 minutos
Alcohol al 50%	5 minutos
Alcohol al 70%	5 minutos
Eosina	5 minutos
Alcohol al 80%	5 minutos
Alcohol al 96%	5 minutos
Alcohol al 96%	5 minutos
Alcohol absoluto	5 minutos
Xilol limpio	5 minutos

### APÉNDICE 3

Secuencias obtenidas del gen 12S rDNA de *Rana montezumae* encontradas en el Jardín Botánico de la UNAM. Se muestran de color azul claro los nucleótidos diferentes.

AY115132 ATGCAACTCTCAGCACACCAGTGAGGACGCCCTTTAGTTCTACTCCAGAAAAA  
 INDIVIDUO 1 ATGCAAGTCTCAGCACACCAGTGAGGACGCCCTTTAGTTCTACTCCAGAAAAA  
 INDIVIDUO 2 ATGCAAGTCTCAGCACACCAGTGAGGACGCCCTTTAGTTCTACTCCAGAAAAA  
 INDIVIDUO 3 ATGCAAGTCTCAGCACACCAGTGAGGACGCCCTTTAGTTCTACTCCAGAAAAA  
 INDIVIDUO 4 ATGCAAGTCTCAGCACACCAGTGAGGACGCCCTTTAGTTCTACTCCAGAAAAA  
 INDIVIDUO 5 ATGCAAGTCTCAGCACACCAGTGAGGACGCCCTTTAGTTCTACTCCAGAAAAA  
 INDIVIDUO 6 ATGCAAGTCTCAGCACACCAGTGAGGACGCCCTTTAGTTCTACTCCAGAAAAA  
 INDIVIDUO 7 ATGCAAGTCTCAGCACACCAGTGAGGACGCCCTTTAGTTCTACTCCAGAAAAA  
 INDIVIDUO 8 ATGCAAGTCTCAGCACACCAGTGAGGACGCCCTTTAGTTCTACTCCAGAAAAA

AY115132 GGAGCCGGTATCAGGCACAAA\*CCGCCACAACACCTAGTCCCACCACACCCC  
 INDIVIDUO 1 GGAGCCGGTATCAGGCACAAA\*CCGCCACAACACCTAGTCCCACCACACCCC  
 INDIVIDUO 2 GGAGCCGGTATCAGGCACAAA\*CCGCCACAACACCTAGTCCCACCACACCCC  
 INDIVIDUO 3 GGAGCCGGTATCAGGCACAAA\*CCGCCACAACACCTAGTCCCACCACACCCC  
 INDIVIDUO 4 GGAGCCGGTATCAGGCACAAA\*CCGCCACAACACCTAGTCCCACCACACCCC  
 INDIVIDUO 5 GGAGCCGGTATCAGGCACAAA\*CCGCCACAACACCTAGTCCCACCACACCCC  
 INDIVIDUO 6 GGAGCCGGTATCAGGCACAAA\*CCGCCACAACACCTAGTCCCACCACACCCC  
 INDIVIDUO 7 GGAGCCGGTATCAGGCACAAA\*CCGCCACAACACCTAGTCCCACCACACCCC  
 INDIVIDUO 8 GGAGCCGGTATCAGGCACAAA\*CCGCCACAACACCTAGTCCCACCACACCCC

AY115132 CAAGGGTAATCAGCAGTGATTAATCTTGTACATAAAGCGTAAGCTTGATTTCAGTT  
 INDIVIDUO 1 CAAGGGTAATCAGCAGTGATTAATCTTGTACATAAAGCGTAAGCTTGATTTCAGTT  
 INDIVIDUO 2 CAAGGGTAATCAGCAGTGATTAATCTTGTACATAAAGCGTAAGCTTGATTTCAGTT  
 INDIVIDUO 3 CAAGGGTAATCAGCAGTGATTAATCTTGTACATAAAGCGTAAGCTTGATTTCAGTT  
 INDIVIDUO 4 CAAGGGTAATCAGCAGTGATTAATCTTGTACATAAAGCGTAAGCTTGATTTCAGTT  
 INDIVIDUO 5 CAAGGGTAATCAGCAGTGATTAATCTTGTACATAAAGCGTAAGCTTGATTTCAGTT  
 INDIVIDUO 6 CAAGGGTAATCAGCAGTGATTAATCTTGTACATAAAGCGTAAGCTTGATTTCAGTT  
 INDIVIDUO 7 CAAGGGTAATCAGCAGTGATTAATCTTGTACATAAAGCGTAAGCTTGATTTCAGTT  
 INDIVIDUO 8 CAAGGGTAATCAGCAGTGATTAATCTTGTACATAAAGCGTAAGCTTGATTTCAGTT

AY115132 AAAGAAAAGAGGGCCGGCCAACATTGGTGCCAGCCGCCGGCTACACCCTAG  
 INDIVIDUO 1 AAAGAAAAGAGGGCCGGCCAACATTGGTGCCAGCCGCCGGCTACACCCTAG  
 INDIVIDUO 2 AAAGAAAAGAGGGCCGGCCAACATTGGTGCCAGCCGCCGGCTACACCCTAG  
 INDIVIDUO 3 AAAGAAAAGAGGGCCGGCCAACATTGGTGCCAGCCGCCGGCTACACCCTAG  
 INDIVIDUO 4 AAAGAAAAGAGGGCCGGCCAACATTGGTGCCAGCCGCCGGCTACACCCTAG  
 INDIVIDUO 5 AAAGAAAAGAGGGCCGGCCAACATTGGTGCCAGCCGCCGGCTACACCCTAG  
 INDIVIDUO 6 AAAGAAAAGAGGGCCGGCCAACATTGGTGCCAGCCGCCGGCTACACCCTAG  
 INDIVIDUO 7 AAAGAAAAGAGGGCCGGCCAACATTGGTGCCAGCCGCCGGCTACACCCTAG  
 INDIVIDUO 8 AAAGAAAAGAGGGCCGGCCAACATTGGTGCCAGCCGCCGGCTACACCCTAG

AY115132 GGCCCCGAGTTGATAATCATCGGCGTTAAGCGTGATTAAAGTAATTAGAAACTA  
 INDIVIDUO 1 GGCCCCGAGTTGATAATCATCGGCGTTAAGCGTGATTAAAGTAATTAGAAACTA  
 INDIVIDUO 2 GGCCCCGAGTTGATAATCATCGGCGTTAAGCGTGATTAAAGTAATTAGAAACTA  
 INDIVIDUO 3 GGCCCCGAGTTGATAATCATCGGCGTTAAGCGTGATTAAAGTAATTAGAAACTA  
 INDIVIDUO 4 GGCCCCGAGTTGATAATCATCGGCGTTAAGCGTGATTAAAGTAATTAGAAACTA  
 INDIVIDUO 5 GGCCCCGAGTTGATAATCATCGGCGTTAAGCGTGATTAAAGTAATTAGAAACTA  
 INDIVIDUO 6 GGCCCCGAGTTGATAATCATCGGCGTTAAGCGTGATTAAAGTAATTAGAAACTA  
 INDIVIDUO 7 GGCCCCGAGTTGATAATCATCGGCGTTAAGCGTGATTAAAGTAATTAGAAACTA  
 INDIVIDUO 8 GGCCCCGAGTTGATAATCATCGGCGTTAAGCGTGATTAAAGTAATTAGAAACTA

AY115132 GGATTAATAATGCTTAGCAGTTTTATGCTTGCTATTAAGAAATACACAAACG  
INDIVIDUO 1 GGATTAATAATGCTTAGCAGTTTTATGCTTGCTATTAAGAAATACACAAACG  
INDIVIDUO 2 GGATTAATAATGCTTAGCAGTTTTATGCTTGCTATTAAGAAATACACAAACG  
INDIVIDUO 3 GGATTAATAATGCTTAGCAGTTTTATGCTTGCTATTAAGAAATACACAAACG  
INDIVIDUO 4 GGATTAATAATGCTTAGCAGTTTTATGCTTGCTATTAAGAAATACACAAACG  
INDIVIDUO 5 GGATTAATAATGCTTAGCAGTTTTATGCTTGCTATTAAGAAATACACAAACG  
INDIVIDUO 6 GGATTAATAATGCTTAGCAGTTTTATGCTTGCTATTAAGAAATACACAAACG  
INDIVIDUO 7 GGATTAATAATGCTTAGCAGTTTTATGCTTGCTATTAAGAAATACACAAACG  
INDIVIDUO 8 GGATTAATAATGCTTAGCAGTTTTATGCTTGCTATTAAGAAATACACAAACG

AY115132 AAAGTTATCCTATATACATATACTTGAATACACGACAGCTAGGAAGACAACT  
INDIVIDUO 1 AAAGTTATCCTATATACATATACTTGAATACACGACAGCTAGGAAGACAACT  
INDIVIDUO 2 AAAGTTATCCTATATACATATACTTGAATACACGACAGCTAGGAAGACAACT  
INDIVIDUO 3 AAAGTTATCCTATATACATATACTTGAATACACGACAGCTAGGAAGACAACT  
INDIVIDUO 4 AAAGTTATCCTATATACATATACTTGAATACACGACAGCTAGGAAGACAACT  
INDIVIDUO 5 AAAGTTATCCTATATACATATACTTGAATACACGACAGCTAGGAAGACAACT  
INDIVIDUO 6 AAAGTTATCCTATATACATATACTTGAATACACGACAGCTAGGAAGACAACT  
INDIVIDUO 7 AAAGTTATCCTATATACATATACTTGAATACACGACAGCTAGGAAGACAACT  
INDIVIDUO 8 AAAGTTATCCTATATACATATACTTGAATACACGACAGCTAGGAAGACAACT

AY115132 GGGATTAGATACCCCACTATGCCTAGCCGTAAACAATTAACCTTACACCCATCAG  
INDIVIDUO 1 GGGATTAGATACCCCACTATGCCTAGCCGTAAACAATTAACCTTACACCCATCAG  
INDIVIDUO 2 GGGATTAGATACCCCACTATGCCTAGCCGTAAACAATTAACCTTACACCCATCAG  
INDIVIDUO 3 GGGATTAGATACCCCACTATGCCTAGCCGTAAACAATTAACCTTACACCCATCAG  
INDIVIDUO 4 GGGATTAGATACCCCACTATGCCTAGCCGTAAACAATTAACCTTACACCCATCAG  
INDIVIDUO 5 GGGATTAGATACCCCACTATGCCTAGCCGTAAACAATTAACCTTACACCCATCAG  
INDIVIDUO 6 GGGATTAGATACCCCACTATGCCTAGCCGTAAACAATTAACCTTACACCCATCAG  
INDIVIDUO 7 GGGATTAGATACCCCACTATGCCTAGCCGTAAACAATTAACCTTACACCCATCAG  
INDIVIDUO 8 GGGATTAGATACCCCACTATGCCTAGCCGTAAACAATTAACCTTACACCCATCAG

AY115132 CGCCAGGGAACTACGAGCAATGCTTAAAACCCAAAGGATTTGACGGTGTCCCA  
INDIVIDUO 1 CGCCAGGGAACTACGAGCAATGCTTAAAACCCAAAGGATTTGACGGTGTCCCA  
INDIVIDUO 2 CGCCAGGGAACTACGAGCAATGCTTAAAACCCAAAGGATTTGACGGTGTCCCA  
INDIVIDUO 3 CGCCAGGGAACTACGAGCAATGCTTAAAACCCAAAGGATTTGACGGTGTCCCA  
INDIVIDUO 4 CGCCAGGGAACTACGAGCAATGCTTAAAACCCAAAGGATTTGACGGTGTCCCA  
INDIVIDUO 5 CGCCAGGGAACTACGAGCAATGCTTAAAACCCAAAGGATTTGACGGTGTCCCA  
INDIVIDUO 6 CGCCAGGGAACTACGAGCAATGCTTAAAACCCAAAGGATTTGACGGTGTCCCA  
INDIVIDUO 7 CGCCAGGGAACTACGAGCAATGCTTAAAACCCAAAGGATTTGACGGTGTCCCA  
INDIVIDUO 8 CGCCAGGGAACTACGAGCAATGCTTAAAACCCAAAGGATTTGACGGTGTCCCA

AY115132 CCCAACTAGAGGAGCCTGTTCTTTAATCGATGATCCCCGCTACACCTGACCATT  
INDIVIDUO 1 CCCAACTAGAGGAGCCTGTTCTTTAATCGATGATCCCCGCTACACCTGACCATT  
INDIVIDUO 2 CCCAACTAGAGGAGCCTGTTCTTTAATCGATGATCCCCGCTACACCTGACCATT  
INDIVIDUO 3 CCCAACTAGAGGAGCCTGTTCTTTAATCGATGATCCCCGCTACACCTGACCATT  
INDIVIDUO 4 CCCAACTAGAGGAGCCTGTTCTTTAATCGATGATCCCCGCTACACCTGACCATT  
INDIVIDUO 5 CCCAACTAGAGGAGCCTGTTCTTTAATCGATGATCCCCGCTACACCTGACCATT  
INDIVIDUO 6 CCCAACTAGAGGAGCCTGTTCTTTAATCGATGATCCCCGCTACACCTGACCATT  
INDIVIDUO 7 CCCAACTAGAGGAGCCTGTTCTTTAATCGATGATCCCCGCTACACCTGACCATT  
INDIVIDUO 8 CCCAACTAGAGGAGCCTGTTCTTTAATCGATGATCCCCGCTACACCTGACCATT

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

AY115132 TCTTGCTCATCAGTCTGTATACCTCCGTCGAAAGCTTACCATGTGAACGTCCTC  
INDIVIDUO 1 TCTTGCTCATCAGTCTGTATACCTCCGTCGAAAGCTTACCATGTGAACGTCCTC  
INDIVIDUO 2 TCTTGCTCATCAGTCTGTATACCTCCGTCGAAAGCTTACCATGTGAACGTCCTC  
INDIVIDUO 3 TCTTGCTCATCAGTCTGTATACCTCCGTCGAAAGCTTACCATGTGAACGTCCTC  
INDIVIDUO 4 TCTTGCTCATCAGTCTGTATACCTCCGTCGAAAGCTTACCATGTGAACGTCCTC  
INDIVIDUO 5 TCTTGCTCATCAGTCTGTATACCTCCGTCGAAAGCTTACCATGTGAACGTCCTC  
INDIVIDUO 6 TCTTGCTCATCAGTCTGTATACCTCCGTCGAAAGCTTACCATGTGAACGTCCTC  
INDIVIDUO 7 TCTTGCTCATCAGTCTGTATACCTCCGTCGAAAGCTTACCATGTGAACGTCCTC  
INDIVIDUO 8 TCTTGCTCATCAGTCTGTATACCTCCGTCGAAAGCTTACCATGTGAACGCCCTC

AY115132 AGTAGGCTCAATGATCTATAACACATCAACACGTCAGGTCAAGGTGCAACTTA  
INDIVIDUO 1 AGTAGGCTCAATGATCTATAACACATCAACACGTCAGGTCAAGGTGCAACTTA  
INDIVIDUO 2 AGTAGGCTCAATGATCTATAACACATCAACACGTCAGGTCAAGGTGCAACTTA  
INDIVIDUO 3 AGTAGGCTCAATGATCTATAACACATCAACACGTCAGGTCAAGGTGCAACTTA  
INDIVIDUO 4 AGTAGGCTCAATGATCTATAACACATCAACACGTCAGGTCAAGGTGCAACTTA  
INDIVIDUO 5 AGTAGGCTCAATGATCTATAACACATCAACACGTCAGGTCAAGGTGCAACTTA  
INDIVIDUO 6 AGTAGGCTCAATGATCTATAACACATCAACACGTCAGGTCAAGGTGCAACTTA  
INDIVIDUO 7 AGTAGGCTCAATGATCTATAACACATCAACACGTCAGGTCAAGGTGCAACTTA  
INDIVIDUO 8 AGTAGGCTCAATGATCTATAACACATCAACACGTCAGGTCAAGGTGCAACTTA

AY115132 AGAAATGGGAAGTAATTGGCTACAATTTCTAATCTAGAACAAAACGAAAGGCTA  
INDIVIDUO 1 AGAAATGGGAAGTAATTGGCTACAATTTCTAATCTAGAACAAAACGAAAGGCTA  
INDIVIDUO 2 AGAAATGGGAAGTAATTGGCTACAATTTCTAATCTAGAACAAAACGAAAGGCTA  
INDIVIDUO 3 AGAAATGGGAAGTAATTGGCTACAATTTCTAATCTAGAACAAAACGAAAGGCTA  
INDIVIDUO 4 AGAAATGGGAAGTAATTGGCTACAATTTCTAATCTAGAACAAAACGAAAGGCTA  
INDIVIDUO 5 AGAAATGGGAAGTAATTGGCTACAATTTCTAATCTAGAACAAAACGAAAGGCTA  
INDIVIDUO 6 AGAAATGGGAAGTAATTGGCTACAATTTCTAATCTAGAACAAAACGAAAGGCTA  
INDIVIDUO 7 AGAAATGGGAAGTAATTGGCTACAATTTCTAATCTAGAACAAAACGAAAGGCTA  
INDIVIDUO 8 AGAAATGGGAAGTAATTGGCTACAATTTCTAATCTAGAACAAAACGAAAGGCTA

AY115132 TGTGAAACCATAGCAGCGAAGGTGGATTTAGTAGTAAAAAGAAAACAGAG  
INDIVIDUO 1 TGTGAAACCATAGCAGCGAAGGTGGATTTAGTAGTAAAAAGAAAACAGAGTGT  
INDIVIDUO 2 TGTGAAACCATAGCAGCGAAGGTGGATTTAGTAGTAAAAAGAAAACAGAGTGT  
INDIVIDUO 3 TGTGAAACCATAGCAGCGAAGGTGGATTTAGTAGTAAAAAGAAAACAGAGTGT  
INDIVIDUO 4 TGTGAAACCATAGCAGCGAAGGTGGATTTAGTAGTAAAAAGAAAACAGAGTGT  
INDIVIDUO 5 TGTGAAACCATAGCAGCGAAGGTGGATTTAGTAGTAAAAAGAAAACAGAGTGT  
INDIVIDUO 6 TGTGAAACCATAGCAGCGAAGGTGGATTTAGTAGTAAAAAGAAAACAGAGTGT  
INDIVIDUO 7 TGTGAAACCATAGCAGCGAAGGTGGATTTAGTAGTAAAAAGAAAACAGAGTGT  
INDIVIDUO 8 TGTGAAACCATAGCAGCGAAGGTGGATTTAGTAGTAAAAAGAAAACAGAGTGT

INDIVIDUO 1 TCTTTTTAACCCGGCTCTGGGATGCGTACACA  
INDIVIDUO 2 TCTTTTTAACCCG  
INDIVIDUO 3 TCTTTTTAACCCGGCTCTGGGATGCGTACACA  
INDIVIDUO 4 TCTTTTTAACCCGGCTCTGGGATGCGTACACA  
INDIVIDUO 5 TCTTTTTAACCCGGCTCTGGGATGCGTACACA  
INDIVIDUO 6 TCTTTTTAACCCGGCTCTGGGATGCGTACACA  
INDIVIDUO 7 TCTTTTTAACCCGGCTCTGGGATGCGTACACA  
INDIVIDUO 8 TCTTTTTAACCCGGCTCTGGGATGCGTACACA