



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**



**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ANUROS EN ALGUNAS
LOCALIDADES DE LA RESERVA DE LA BIOSFERA SIERRA
GORDA, QUERÉTARO**

TESIS INDIVIDUAL

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

ROGELIO MANUEL GARCÍA SOLÍS

DIRIGIDO POR:

DRA. PATRICIA HERRERA PANIAGUA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO. AGOSTO 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
Licenciatura en Biología



“Identificación molecular de anuros en algunas localidades de la Reserva de la Biosfera Sierra Gorda, Querétaro”

Tesis individual

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Licenciado en Biología

Presenta:

Rogelio Manuel García Solís

Dirigido por:

Dra. Patricia Herrera Paniagua

Sinodales:

Dra. Patricia Herrera Paniagua

Presidente

Firma

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez

Secretaria

Firma

Dr. Carlos Alberto López Gonzáles

Vocal

Firma

Dra. Noemí Matías Ferrer

Suplente

Firma

Dra. Juana Elizabeth Elton Puente

Directora

Facultad de Ciencias Naturales

Centro Universitario, Querétaro, Qro. Agosto 2020.

RESUMEN

Los anuros son un grupo de anfibios que destacan por su alta diversidad en el mundo y su distribución cosmopolita. Sin embargo, se considera que sus poblaciones han tenido un descenso importante por diferentes factores tanto bióticos como abióticos, como el cambio climático, la destrucción de su hábitat y por enfermedades. En el estado de Querétaro la información sobre la diversidad de anuros es muy escasa. Por lo que este trabajo exploró el uso de herramientas moleculares para determinar la identidad taxonómica de anuros dentro de la Reserva de la Biosfera Sierra Gorda (RBSG). Se utilizaron muestras de tejido muscular e hisopados bucales de organismo larvales y adultos (respectivamente), de los cuales se extrajo ADN y mediante PCR a punto final se obtuvieron secuencias parciales de del gen 16s del ARN ribosomal de 600-650 pb. La identidad molecular se hizo comparando las secuencias de las muestras respecto a las secuencias del GenBank, para corroborar la identidad taxonómica se realizó un análisis de distancias genéticas inter e intraespecífica. A su vez se determinó el estatus de conservación de las especies y se estableció su distribución geográfica usando la plataforma en línea Global Biodiversity Information Facility (GBIF). En total se tomaron muestras de 23 individuos recolectados en ocho localidades de cuatro municipios del estado de Querétaro. Por su identidad molecular se confirman cuatro especies de tres familias. De estas especies todas están en alguna categoría de riesgo, en preocupación menor y casi amenazadas por la IUCN y una está en protección especial por la NOM-059-SEMARNAT-2010. Acorde a los registros de distribución geográfica, se encontraron seis localidades que no habían sido previamente registradas las cuatro especies. En conclusión, las técnicas moleculares son una herramienta útil para la identificación y que pueden ser una herramienta excelente en el monitoreo de anfibios tanto en estadios larvales como adultos.

Palabras clave: Anfibios, Conservación, Distancias genéticas, PCR Códigos de Barras

SUMMARY

Anurans are a group of amphibians that stand out for their high diversity in the world and their cosmopolitan distribution. However, the populations have had a significant decline due to different factors, both biotic and abiotic, such as climate change, the habitat destruction and diseases. In the Querétaro state, information on anura diversity is very scarce. Therefore, this work explored the use of molecular tools to determine the taxonomic identity of anurans within the Sierra Gorda Biosphere Reserve (RBSG). Samples of muscle tissue and buccal swabs from larval and adult organisms (respectively) were used, from which DNA was extracted and partial sequences of the 16s gene of 600-650 bp ribosomal RNA were obtained by endpoint PCR. The molecular identity was made by comparing the sequences of the samples with respect to the sequences of the GenBank, to corroborate the taxonomic identity, an analysis of inter and intraspecific genetic distances was performed. In turn, the conservation status of the species was determined and their geographical distribution was established using the Global Biodiversity Information Facility (GBIF) online platform. In total, samples were taken from 23 individuals collected from eight locations in four municipalities in the state of Querétaro. Four species from three families are confirmed by their molecular identity. Of these species all are in some category of risk, of minor concern and almost threatened by the IUCN and one is in special protection by NOM-059-SEMARNAT-2010. According to the geographical distribution records, six localities were found that the four species had not been previously registered. In conclusion, molecular techniques are a useful tool for identification and can be an excellent tool for monitoring amphibians in both larval and adult stages.

Keywords: Amphibian, Conservation, Genetic distances, PCR, Bar codes

DEDICATORIAS

A mis padres

Que, por sus esfuerzos, sacrificios y dedicación hacia mí, he podido salir adelante con mis sueños y metas. Agradezco a mi madre por su apoyo constante a lo largo de los años y sobre todo en la confianza y amor que ha depositado en mí. A mi padre le agradezco que me haya enseñado a apreciar lo importante y hermosa que es la naturaleza, y por lo cual yo estudie esta rama de la ciencia, así como le agradezco su apoyo constante para poder estudiarla.

A mis hermanos y sobrinas

Por ser parte de mi vida a pesar de las diferencias que hemos tenido durante los años, siempre me han ayudado durante todo este tiempo, y a mis sobrinas por siempre ser la chispa de alegría y felicidad que siempre me ayudaban a sobrellevar los días malos.

A mi directora y sinodales

Por su apoyo constate a pesar de las adversidades del proyecto y siempre impulsarme a dar lo mejor y siempre ver las cosas con buena cara. A su vez por su apoyo emocional para lograr mis metas. A mis sinodales por su apoyo tanto en campo y laboratorio y sus correcciones.

A mis amigos

Por su apoyo y amistad durante todo este tiempo y sobre todo por aguantarme durante estos cinco años, quiero agradecer a Nancy, Juano, Tere y Manuel por ser siempre mis consejeros, cómplices, compañeros de chismes y equipo durante todas las materias y salidas de campo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al programa FOFI por aprobar y financiar el proyecto del cual se deriva esta tesis.

A la Dra. Patricia Herrera Paniagua por su apoyo constante, y su guía durante la carrera y sobre todo en la escritura de esta tesis al igual que los artículos que se derivaron de este proyecto y su apoyo constante canalizándome con las personas con las cuales pudiera resolver las dudas. A el laboratorio de Botánica de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ por el uso de sus instalaciones

Agradezco a la Dra. Mónica Yanira Rodríguez Pérez por dejarme ser parte de este proyecto y por impulsarme durante este largo camino, así como por su asesoría en la parte de campo y aumentar mis conocimientos teóricos.

Agradezco a la Dra. Noemí Matías Ferrer por su orientación en la interpretación de los análisis moleculares, así como su guía en las correcciones del escrito.

Al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ y en especial a la QFB Susana Lucía Sosa Gallegos por su apoyo técnico y colaboración en las pruebas de PCR.

Al laboratorio de Zoología de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ por su apoyo en las salidas de campo, en laboratorio y por brindar las instalaciones, en especial al técnico del laboratorio Gabriela M. Camargo Aguilera por su guía y apoyo.

Agradezco al Dr. Carlos Alberto López Gonzáles, por su apoyo y orientación para la realización del trabajo de campo, así como el trabajo de laboratorio. Por sus consejos y enseñanzas durante la carrera.

A la Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez por instruirme y ampliar mi conocimiento en laboratorio y ser parte del apoyo en el mismo.

Agradezco al Dr. Sean Rovito por su ayuda en el protocolo de PCR utilizado.

Quiero agradecer a Juan Omar Reyes Sánchez y a mi padre por su ayuda en campo para la obtención de las muestras

ÍNDICE

Resumen	3	
Summary	4	
Dedicatorias	5	
Agradecimientos.....	6	
Índice de cuadros	9	
Índice de Figuras	10	
I. MARCO TEÓRICO		
1.1 Generalidades de los Anuros	12	
1.2 Importancia y problemática de conservación que enfrentan	13	
1.3 Problemática de muestreo e identificación	14	
1.4 Técnica molecular de identificación	15	
1.4.1 Ventajas y Desventajas de la Identificación molecular	15	
1.4.2 Fundamentos de la PCR.....	16	
1.4.3 Gen mitocondrial 16s ARN ribosomal	17	
II. ANTECEDENTES		
2.1 Identificación molecular de anfibios en México	18	
2.2 Anuros en Querétaro	19	
2.3 Identificación molecular de Vertebrados e invertebrados en Querétaro	19	
III. JUSTIFICACIÓN.....		21
IV. OBJETIVOS		
4.1 Objetivo general	21	
4.2 Objetivo específicos	21	
V. MATERIALES Y MÉTODOS		
5.1 Trabajo de campo	22	
5.1.1 Área de estudio	22	
5.1.2 Colecta y procesamiento del material biológico	23	
5.2 Trabajo de laboratorio	28	
5.2.1 Extracción de ADN	28	

5.2.2 Estandarización y amplificación por PCR punto final	28
5.2.3 Cuantificación y visualización de los productos de PCR en geles de agarosa.....	29
5.3 Análisis de datos	30
5.3.1 Análisis molecular.....	30
5.3.2 Datos geográficos y estado de conservación	31
VI. RESULTADOS	
6.1 Obtención de muestras	32
6.2 Técnica molecular	32
6.2.1 Estandarización de la técnica de PCR punto final	32
6.2.2 Análisis moleculares e identidad molecular	34
6.3 Distribución y estatus de conservación	39
6.3.1 Distribución en la RBSG	39
6.3.2 Estatus de conservación	42
VII. DISCUSIÓN	
7.1 Técnicas moleculares e identificación molecular	43
7.1.1 Identificación molecular	43
7.1.2 Identificación molecular de larvas	45
7.1.3 Hisopados bucales	45
7.1.4 Problemas taxonómicos de las especies	46
7.2 Diversidad	46
VIII. CONCLUSIONES	48
IX. ANEXO	
Anexo 1 Protocolo de extracción de ADN	49
Anexo 2 Reactivos utilizados para cada enzima en los experimentos para PCR.....	50
Anexo 3 Muestras procesadas en el estudio	51
Anexo 4 Distancias genéticas de las especies	52
Anexo 5 Datos GBIF y muestreos	56
Anexo 6 Especies de anuros en la RBSG.....	57
X. LITERATURA CITADA	60

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 5.1. Características ambientales del sitio de estudio	24
Cuadro 5.2. Oligonucleótidos	29
Cuadro 5.3. Programa de amplificación Rovito et al. (2019).....	29
Cuadro 5.4. Programa de amplificación Gunther et al. (2016)	29
Cuadro 5.5. Secuencias obtenidas de GenBank de grupos externos	31
Cuadro 6.1. Familias y especies representados por genotipo y porcentaje de identidad.....	34
Cuadro 6.2. Secuencias con un porcentaje de similitud (BLAST).....	35
Cuadro 6.3. Distancias genéticas interespecíficas de cuatro especies de anuros de la Sierra Gorda y secuencias de referencia (Genbank)	35
Cuadro 6.4. Localidades que amplían la distribución de los anuros de la RBSG	39
Cuadro 6.5. Listado de especies y su categoría de riesgo	42
Cuadro 9.1. Reactivos para la mezcla de PCR utilizando como enzima Phusion Hot Start II DNA Polymerase Thermo Scientific®	50
Cuadro 9.2. Reactivos para la mezcla de PCR utilizando como enzima GoTaq Flexi DNA Polymerase de PROMEGA®	50
Cuadro 9.3. Reactivos para la mezcla de PCR utilizando como enzima Master Mix Green Taq PROMEGA®	50
Cuadro 9.4. Muestras obtenidas por localidad y especie	51
Cuadro 9.5. Distancias genéticas interespecíficas	52
Cuadro 9.6. Distancias genéticas intraespecíficas <i>E. miotympanum</i>	53
Cuadro 9.7 Distancias genéticas intraespecíficas <i>I. nebulifer</i>	53
Cuadro 9.8 Distancias genéticas intraespecíficas <i>L. berlandieri</i>	54
Cuadro 9.9 Distancias genéticas intraespecíficas <i>R. horribilis</i>	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Mapa de la distribución de anuros en el mundo	12
Figura 1.2. Proceso de replicación a nivel celular	17
Figura 5.1. Reserva de la Biosfera Sierra Gorda Queretana	23
Figura 5.2. Localidades de colecta de los anfibios dentro RBSG	24
Figura 5.3. Ejemplos de larva familia Hylidae	25
Figura 5.4. Estadio juvenil <i>Ecnomiohyla miotympanum</i>	25
Figura 5.5. Estadios adultos	26
Figura 5.6. Colecta de organismos con red manual	27
Figura 5.7. Toma de muestras de hisopados bucales	27
Figura 6.1. Número de individuos capturados por estadios	32
Figura 6.2. Geles de la electroforesis del PCR de punto final con la comparación entre las enzimas con el programa de Gunther et al. (2016).....	33
Figura 6.3. Geles de la electroforesis del PCR de punto final con la comparación entre las enzimas con el programa de Rovito et al. (2019)	33
Figura 6.4. Electroforesis de PCR punto final de muestras mixtas usando la enzima Master mix	34
Figura 6.5. Parte superior del árbol Neighbor Joining, de la divergencia interespecífica ...	36
Figura 6.6. Parte inferior del árbol Neighbor Joining, de la divergencia interespecífica	37
Figura 6.7. Porcentaje de individuos por familia	38
Figura 6.8. Distribución de <i>E. miotympanum</i>	40
Figura 6.9. Distribución de <i>I. nebulifer</i>	40
Figura 6.10. Distribución de <i>L. berlandieri</i>	41
Figura 6.11. Distribución de <i>R. horribilis</i>	41

Figura 9.1. Árbol Neighbor Joining <i>E. miotympanum</i>	52
Figura 9.2. Árbol Neighbor Joining <i>I. nebulifer</i>	53
Figura 9.3. Árbol Neighbor Joining <i>L. berlandieri</i>	54
Figura 9.4. Árbol Neighbor Joining <i>R. horribilis</i>	55
Figura 9.5. Ampliación de la distribución en localidades de la RBSG para anuros.....	56
Figura 9.6 Amplexo de <i>E. miotympanum</i>	57
Figura 9.7. Adulto de <i>I. nebulifer</i>	58
Figura 9.8 Abrevadero donde se encontró larvas de <i>L. berlandieri</i>	59

Dirección General de Bibliotecas UAQ

I. MARCO TEÓRICO

1.1 Generalidades de los Anuros

Los anuros (comúnmente conocidos como ranas y sapos) son un grupo de anfibios caracterizados por: 1) cuerpos cortos con una longitud de hocico-cloaca variables de hasta 30 cm, 2) con patas traseras más largas que la longitud del cuerpo, 3) las patas delanteras más cortas que las traseras y 4) no presentan dientes (Parra-Olea et al., 2014). Estos organismos se destacan por ocupar un gran número de nichos en diversos ecosistemas alrededor del mundo, teniendo diversas adaptaciones para su establecimiento; lo que explica su diversidad. Por su distribución mundial, a los anuros se les considera cosmopolitas porque los encontramos en casi cualquier lugar del mundo, con excepción de lugares con temperaturas muy bajas (polos y tundras), o en los desiertos más secos (el desierto del Sahara y Atacama), así como en islas oceánicas (Figura 1.1) (Kenneth, 2009; Wake & Koo, 2018).

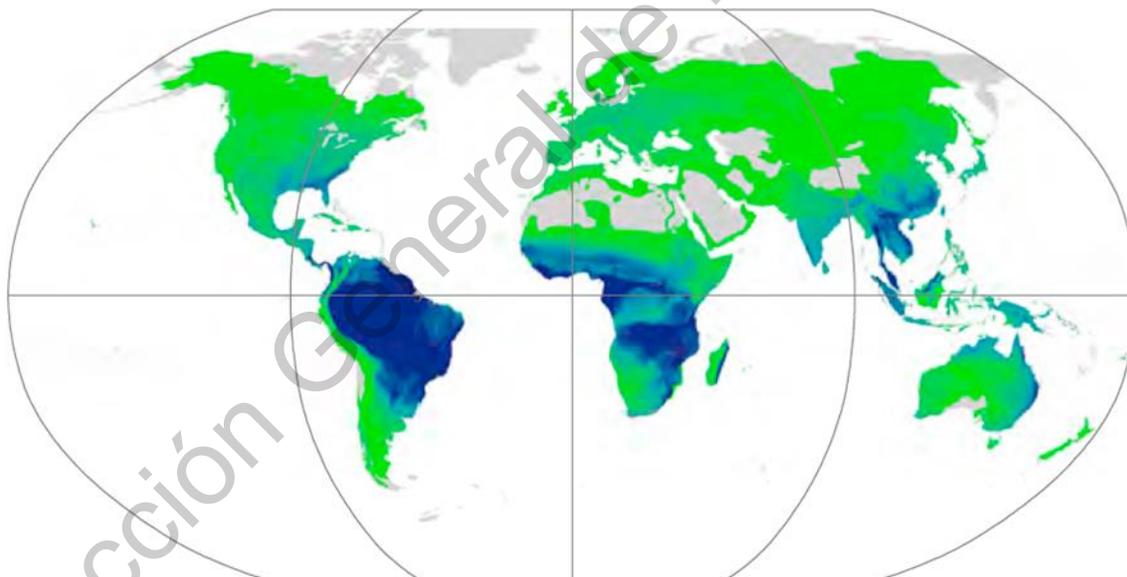


Figura 1.1.- Mapa de la distribución de anuros en el mundo, los colores azules indican una alta riqueza mientras los colores verdes una baja riqueza y los colores grises una riqueza nula. Imagen obtenida de Wake & Koo (2018)

De los anfibios, los anuros son el grupo más diverso del mundo pues incluye 7164 especies, representado el 88% de todos los anfibios (AmphibianWeb, 2020). En el mundo, Brasil, Colombia, Ecuador, Perú y México son los países donde se encuentra la mayor diversidad de estos organismos. Nuestro país ocupa el quinto lugar en diversidad con 242 especies de

anuros reconocidos (el 5% de todas las especies a nivel mundial) de las cuales el 60% son endémicas (Parra-Olea et al., 2014; AmphibianWeb, 2020).

1.2 Importancia de los anuros y problemática de conservación

Los anuros son esenciales en la cadena trófica, ocupando numerosos nichos tróficos que van desde planctívoros hasta carnívoros, cualidad dada por su ciclo de vida puesto que en etapas tempranas o larval se desarrollan en ecosistemas acuáticos (con excepciones) y en estados maduros (adultos) en ecosistemas terrestres (Hopkins, 2007). Además, este tipo de anfibios son presa de un gran número de depredadores, desde aves, mamíferos (incluyendo los humanos), reptiles, peces y algunos otros anuros; los principales depredadores son serpientes y mamíferos. Los anuros son consumidos tanto en estadios larvales como en estadios adultos (Toledo et al., 2007).

Los anuros (y los anfibios en general) también son importantes por los servicios ecosistémicos que brindan, tanto en ecosistemas acuáticos como en terrestres. Los anfibios generan alteraciones directas e indirectas en el ecosistema y en algunos casos su hábitat (Valencia-aguilar et al., 2013; Hocking & Babbitt, 2014). En los ambientes acuáticos los renacuajos participan en el reciclaje de nutrientes, en la bioturbación (alteración producida por organismos en los sedimentos, como la acumulación de heces) y en las redes alimentarias, tanto como consumidores primarios, detritívoros, depredadores y caníbales (Hocking & Babbitt, 2014). En los ecosistemas terrestres los adultos son importantes depredadores que regulan las poblaciones de invertebrados, también alteran físicamente su hábitat (refugios subterráneos) y participan en el reciclaje de nutrientes. En general estos organismos cumplen una función muy importante en el transporte de nutrientes y energía a través de los ecosistemas terrestres y acuáticos a lo largo de su ciclo de vida (Hopkins, 2007; Valencia-aguilar et al., 2013; Hocking & Babbitt, 2014).

Por su importancia ecológica, la conservación de los anuros tiene que ser prioritaria en México y en el mundo. Sin embargo, este grupo no ha tenido la protección debida ni se ha priorizado su mantenimiento en los ecosistemas tanto naturales como antropizados. Desde la década de los 80's a la fecha, se ha observado un descenso importante en las poblaciones de muchas especies de anuros (y de anfibios en general) alrededor del mundo. La desaparición de poblaciones enteras, disminución acelerada y hasta la extinción han sido

resultado de estos dramáticos descensos (Angulo, 2002; Becker et al., 2007; Wake & Vredenburg, 2008).

Las causas del descenso de las poblaciones aún no son claras y dependen de las condiciones específicas de cada caso. En general incluyen tanto factores bióticos como abióticos. Entre los abióticos están el calentamiento climático global, el aumento de rayos UV, la contaminación, y la destrucción del hábitat (Parra-Olea et al., 2014). En los factores bióticos se encuentran enfermedades emergentes, causados por bacterias, virus y hongos (Parra-Olea et al., 2014). Las dos principales enfermedades que han afectado en mayor medida a las poblaciones de anuros son ocasionadas por el virus del género *Ranavirus* (causante de la enfermedad conocida como patas rojas) y el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (causante de la quitridiomycosis). A este último se le ha asociado con la extinción de numerosas especies de ranas y sapos como *Rheobatrachus silus* y *Rheobatrachus vitelinus* en los bosques australianos, y *Atelopus varius* y *Bufo periglenes* en Costa Rica (Angulo, 2002). El número de especies afectadas por estas enfermedades, alrededor del mundo, ha ocasionado un importante descenso en las poblaciones de anuros, incluyendo las de nuestro país (Parra-Olea et al., 2014; Mendoza-Almeralla et al., 2015).

1.3 Problemática de monitoreo e identificación

El monitoreo de los anuros es complicado por diversos factores. Uno de estos es la temporalidad, la cual da un margen de trabajo muy corto, puesto que los organismos adultos son fáciles de observar y capturar solo en las temporadas de reproducción en comparación con otros momentos en el año. Durante la época reproductiva la densidad de los adultos es alta, pero después es escasa. El ciclo de vida de cada una de las especies es diferente y variable, pero en general implica que los márgenes de acción para la el monitoreo sean mucho más cortos y aún más cuando son especies raras. Por otro lado, los organismos larvales son más fáciles de observar y estudiar por su baja agilidad, pero la identificación taxonómica es complicada y generalmente se requieren adultos (Balcells, 2001; Heyer et al., 2014; Tessaro & López-González, 2011).

Otro de los grandes problemas en anfibios es su reconocimiento y su identificación taxonómica. Algunos grupos de anfibios son fácilmente reconocibles, pero en otros existe un gran número de especies que comparten características morfológicas similares y

generalizadas (variaciones mínimas, sutiles y que se mantienen en varios organismos) por lo que comparten un mismo nombre científico. Estos forman grupos crípticos, lo que para la taxonomía clásica representa un conflicto en la diferenciación de especies (Angulo, 2002; Cryer et al., 2019). Derivado de este problema se complican las acciones de conservación por una deficiencia en la protección de algunas especies o la sobre protección de otras en las que no son tan necesarias estas medidas, por lo que existe la necesidad de identificar la diversidad y delimitación de las especies crípticas (Cryer et al., 2019; Real et al., 2005). A lo largo de la historia se han intentado resolver los grupos crípticos, nombrando a cada morfo como una especie plena o el reconocimiento de una sola especie y muchas variantes, utilizando técnicas moleculares lo cual está facilitando la identidad de los grupos (Angulo, 2002).

1.4 Técnica molecular de identificación

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés) es una técnica molecular utilizada por investigadores y médicos para obtener *in vitro* millones de copias de un fragmento de ADN a partir de una sola molécula. Esta técnica fue desarrollada por Mullis & Faloona (1987) para obtener fragmentos de ADN replicados, pero el proceso original era poco eficiente, utilizaba grandes cantidades de ADN polimerasa y necesitaba de supervisión durante todo el proceso. Saiki et al. (1988) simplificó y automatizó la técnica utilizando la Taq polimerasa, obtenida a partir de la bacteria *Thermus aquaticus* (Pelt-Verkuil & Belkum, 2008; Serrato-Díaz et al., 2014).

1.4.1 Ventajas y desventajas de la identificación molecular

La incorporación de marcadores moleculares para la identificación y clasificación de los organismos es relativamente nueva (a partir de los ochenta se facilitó con la técnica de PCR) (Sanz, 2005), y con ella se trató de resolver problemas en la identificación morfológica como la plasticidad fenotípica (genotipos que producen diferentes fenotipos en respuesta a condiciones ambientales), diferencias ontogénicas (variación a lo largo de la vida de un organismo) y dimorfismo sexual (variación entre hembras y machos de la misma especie), por mencionar algunos (Cannatella, 1993; Paz et al., 2011).

A principios del siglo XXI el uso de técnicas moleculares era muy caras y requerían equipos e insumos de alto costo y difícil acceso. En la actualidad es una técnica en la que se obtienen resultados rápidos (horas o días) y que con ayuda de las bases de datos globales (los cuales se incrementan y enriquecen constantemente) es relativamente fácil comparar las secuencias obtenidas y obtener una identificación (Cannatella, 1993; Paz et al., 2011; Storfer et al., 2009) de forma económica. A pesar de esto, esta técnica ha tenido muchas críticas, sobre todo el hecho de que solo se utiliza un solo gen para esta comparación, como en los anfibios, en los cuales se ha observado que puede ser difícil la delimitación de especies cuando hay organismos de la misma especie que provienen de regiones geográficas diferentes (Paz et al., 2011).

1.4.2 Fundamento de la PCR

La PCR se basa en el mecanismo de replicación del ADN en las células (Figura 1.2). En el cual, las cadenas binarias de ADN se separan para formar una cadena simple, duplicándose y uniéndose de nuevo en cada proceso. Esta separación y duplicación se ayuda de enzimas como la topoisomerasa y la helicasa, que desenrollan y separan las cadenas de ADN. Posteriormente, la enzima primasa une los cebadores a la cadena de ADN (secuencias de ARN o ADN que se unen al origen de replicación y sirven de guía para que la DNA polimerasa) en el extremo 3' donde la DNA polimerasa inicia la síntesis de una nueva cadena, tomando nucleótidos libres (dNTP's). La DNA polimerasa solo puede crear la cadena de 3'-5', lo que implica que en la cadena complementaria (5'-3'), esta enzima genera fragmentos (conocidos como fragmentos de Okazaki). Para que estos fragmentos sean unidos se utiliza otra enzima llamada ligasa, esta une los fragmentos fosfodiester de las bases nitrogenadas (García-Trejo, 2015).

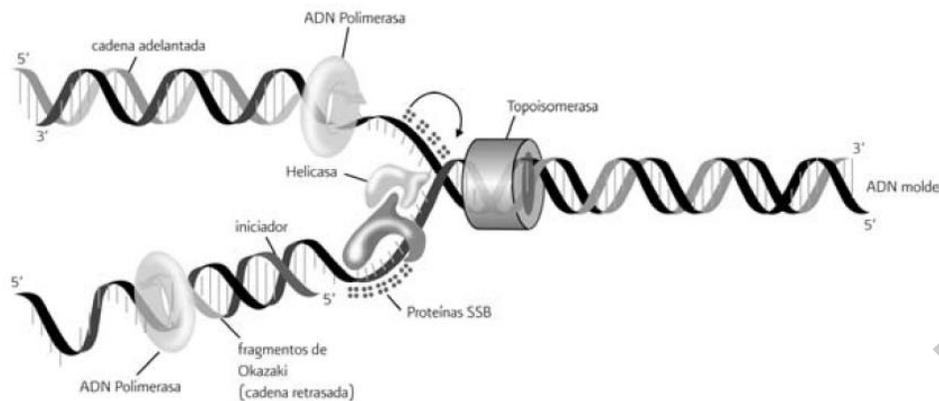


Figura 1.2.- Proceso de replicación del ADN a nivel celular. Imagen obtenida de Serrato-Díaz et al. (2014).

En la técnica de PCR no se utilizan la gran mayoría de las enzimas utilizadas en la replicación celular, en vez de esto se utiliza la temperatura para abrir y cerrar las cadenas binarias. La única enzima utilizada es la DNA polimerasa. Esta técnica utiliza los siguientes pasos: 1) desnaturalización de la cadena binaria de ADN por fusión a temperaturas elevadas; 2) unión de dos oligonucleótidos (cebadores), la cual se realiza a una temperatura menos que la desnaturalización; 3) extensión de la cadena (por DNA polimerasa y como catalizador iones de Mg) por la unión de nucleótidos a partir de los cebadores (García-Trejo, 2015).

Este ciclo es repetido tantas veces como se desee aumentar el número de réplicas de ADN (25 a 35 ciclos). Este gran número de copias permite obtener una alta sensibilidad cuando se tiene muy poco ADN en las muestras y especificidad al detectar únicamente la secuencia para la que se ha diseñado el oligonucleótido (Pelt-Verkuil & Belkum, 2008; García-Trejo, 2015; Serrato-Díaz et al., 2014).

1.4.3 Gen mitocondrial 16S del ARN ribosomal

Los marcadores moleculares se han utilizado como una herramienta para estimar las relaciones filogenéticas de diferentes tipos de organismos. Existen varios marcadores para ello (por ej. aloenzimas y microsátélites) siendo uno de los más utilizados los polimorfismos de secuencias de ADN, la cual es la unidad básica de la variación molecular (Wang et al., 2000). Los genes de ARN ribosomal (ARNr), abarcan cuatro genes ARN de transferencia (ARNt) nuclear (como el 18S y 28S) y dos genes de ARNt mitocondrial (mtARN), son los más utilizados para generar filogenias e identificaciones precisas a nivel

de género y especie. Estos genes mitocondriales, incluyen 12S y 16S, tienen tasas de evolución más rápidas que los genes ARNr nucleares, lo que les infiere mayor poder en diferenciar entre especies (Vences et al., 2005; Wang et al., 2000).

El fragmento mitocondrial de la subunidad 16S del ARN ribosómico, tiene una longitud aproximada de aproximada 600 pares de bases (pb), que se puede obtener con cebadores (“primer”) universales por tratarse de una región altamente conservada entre especies. Además, tiene regiones altamente variables que pueden usarse para diferenciar especies. Por lo que es un gen muy utilizado para la identificación de muchas especies de vertebrados e incluso algunos invertebrados (e.g. arthropoda, cephalopodos) (Mitani et al., 2009; Paternina et al., 2016; Salducci et al., 2002; Vences et al., 2005; Wang et al., 2000). Adicionalmente, esta región es muy conservada lo que facilita el establecimiento del proyecto árbol de la vida universal (All- Species Living Tree Project), en el cual se utilizan las secuencias del gen ARNr 16S como código de barra de comparación (Yarza et al., 2008).

II. ANTECEDENTES

2.1 Identificación molecular de anfibios en México

En México, el uso de las técnicas moleculares para la identificación de animales invertebrados como vertebrados, se ha extendido desde la última década. Estas técnicas han ayudado a resolver numerosas interrogantes tanto de tipo evolutivo (filogenias) como taxonómicas, puesto que ayudan a esclarecer complejos de especies que morfológicamente son difícil distinguir (Parra-Olea, 2004; Parra-Olea et al., 2014)

Para los anfibios del país, se han hecho numerosos estudios, utilizando diversos genes (e.g 16S ARNr, 12S ARNr, COI, mtDNA, cyt b, NADH), para esclarecer relaciones filogenéticas de un gran número de géneros, familias y especies tanto de anuros como de caudados (Bradley & Macknight, 1996; Hay et al., 1995; Mendelson et al., 2011; Parra-Olea, 2004; Parra-Olea et al., 2002, Parra-Olea et al., 2013; Rovito et al., 2012). A su vez, se han utilizado para describir especies nuevas como *Leptobranchella itiokai* (Anura: Megophryidae) (Eto et al., 2016) e *Isthmura corrugata* (Caudata: Plethodontidae) (Sandoval-Comte et al., 2017). Con las herramientas moleculares también se han podido separar complejos de especies como el de *Hypsiboas calcaratus* en la que se descubrieron once especies candidatas, de las cuales cuatro fueron nuevos registros y las demás siguen sin resolverse (Caminer & Ron, 2014). Sin embargo, en otros complejos como el de *Craugastor podiciferus* aún no se han obtenido resultados concluyentes (Streicher et al., 2009).

2.2 Anuros en Querétaro

En el estado de Querétaro los estudios sobre anfibios han sido poco frecuentes y esporádicos. Los que incluyen anuros se concentran en estudios de diversidad de la herpetofauna. El estudio herpetológico del estado más antiguo es el de Dixon et al.(1972) quien registró un total de 93 especies, de los cuales 13 fueron anuros. Por mucho tiempo este fue el único trabajo sobre anfibios y reptiles hasta que Montes-de-Oca (1999) incrementó el número de especies reportando 133 de los cuales 29 especies son anuros. Dixon & Lemos-Espinal (2010) describen no solo la riqueza, sino también corrigen problemas taxonómicos, reportando un total de 113 especies de anfibios y reptiles,

identificando 29 especies de anuros. El listado más actual de la herpetofauna de Querétaro fue hecho por Cruz-Elizalde et al. (2019) quienes describen 138 especies en las que se engloban 27 especies de anuros.

2.3 Identificación molecular de vertebrados e invertebrados en Querétaro

El uso de las técnicas moleculares para la identificación de especies de animales del estado de Querétaro ha sido escaso. Para invertebrados está el trabajo de Gutiérrez (2018) donde se describen las variaciones genéticas de insectos descortezadores utilizando el gen citocromo Oxidasa I (COI), donde concluyen que la variación encontrada dentro de esta especie puede ser explicada por su ubicación geográfica, hospedero y estabilidad genética, y que este gen efectivo para obtener la variación. En los vertebrados se encuentra el estudio de Pérez-Almazán et al. (2017), donde utilizan el gen de la subunidad II de la NADH deshidrogenasa (ND2), que junto a varias características morfológicas, les permiten describir la evolución de un complejo de especies de lagartijas conocidas como *Aspidoscelis gularis*. Para mamíferos López-González et al. (2019) utilizaron excretas y pelo de oso negro (*Ursus americanus*) para confirmar su presencia en la Reserva de la Biosfera Sierra Gorda (RBSG). En este estudio, las muestras fueron amplificadas utilizando los primers de la región citocromo b y D-loop del DNA mitocondrial, dando como resultado la identificación de un macho con un haplotipo mitocondrial B perteneciente al clado oriental de la especie (Sierra madre oriental).

III. JUSTIFICACIÓN

La caracterización y el reconocimiento de las especies son fundamentales para los estudios de biodiversidad y conservación. Los datos morfológicos son esenciales, pero para una identificación certera de las especies de anuros se recomienda usar datos moleculares (Duellman et al., 2016). El conocimiento de la diversidad y distribución de los anuros del estado de Querétaro aún es limitado, incluso en Áreas Naturales Protegidas como la Reserva de la Biósfera Sierra Gorda (RBSG). Por lo que la identificación molecular de las especies de anuros de algunas localidades de la RBSG contribuirá a los estudios de la diversidad y distribución de estos organismos en el estado.

IV. OBJETIVOS

4.1 *Objetivo General*

Determinar la identidad molecular de anuros dentro de la RBSG utilizando el gen 16s ARNr.

4.2 *Objetivo específicos*

1. Estandarizar las técnicas moleculares de extracción de ADN y amplificación de marcadores moleculares del gen 16s ARNr para la identificación de especies de anuros.
2. Identificar molecularmente a las larvas y adultos utilizando como referencia la base de datos de secuencias de ADN “GenBank” y distancias genéticas inter e intraespecíficas.
3. Conocer la distribución geográfica y estado de conservación en el estado, de las especies identificadas, utilizando como referencia la base de datos del “GBIF” e “IUCN”

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Trabajo de campo

5.1.1 Área de estudio

El estudio se hizo en la Reserva de la Biosfera Sierra Gorda (RBSG), dentro del estado Querétaro. La reserva se localiza al norte del estado dentro de los municipios de Arroyo Seco, Jalpan de Serra, Landa de Matamoros, Pinal de Amoles y Peñamiller, y tiene una extensión de 383,567 hectáreas (ha), lo que representa el 32 % de estado de Querétaro (Figura 5.1). La RBSG forma parte de la Sierra Madre Oriental por lo cual tiene una gran variedad de ecosistemas conferidos a la compleja fisiografía y diversidad de climas de la sierra.

La vegetación está representada por bosque tropical subcaducifolio, bosque tropical caducifolio, bosque de encino (*Quercus*), bosque de coníferas, bosque mesófilo de montaña, matorral xerófilo y vegetación de galería o ripario. Los bosques ocupan la mayor extensión de la reserva con 268,250 ha, seguido por el matorral xerófilo quien ocupa una extensión de 61,500 ha. La agricultura y los asentamientos humanos también son característicos del uso de suelo de la reserva. En cuestión de fauna, por sus características físicas y bióticas hacen de la RBSG un corredor biológico con gran cantidad de especies de vertebrados e invertebrados (Carabias-Lillo, Provencio, Maza-Elvira, & Ruiz-Corzo, 1999; CONANP, 2000).

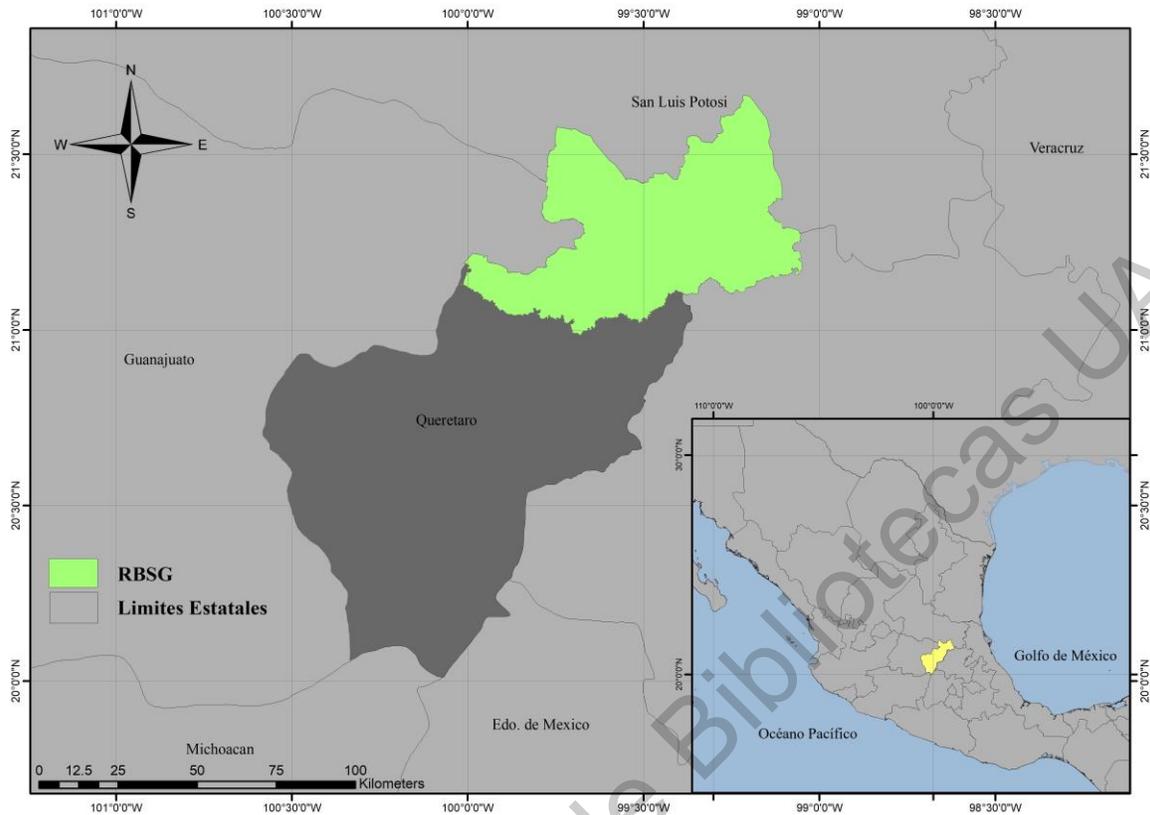


Figura 5.1.- Reserva de la Biosfera Sierra Gorda Queretana (RBSGQ).

5.1.2 Colecta y procesamiento del material biológico

Dentro del área de estudio, se seleccionaron ocho cuerpos de agua en ocho localidades, basados en el registro histórico de la herpetofauna (Dixon & Lemos Espinal, 2010), tipo de vegetación, accesibilidad y sobre todo por su estacionalidad (Figura 5.2). Los sitios de estudio se encuentran en cuatro municipios: Pinal de Amoles, Landa de Matamoros, Jalpan de Serra y Arroyo Seco, localizados desde los 820 m hasta los 1427 m de altitud, y que además incluyen siete tipos de vegetación (Cuadro 5.1). Estos muestreos se realizaron uno por mes, visitando de una a dos localidades, abarcando la temporada de lluvias y principios de la temporada de secas, los muestreos se realizaron en la mañana y tarde antes de la puesta del sol.

La recolecta se realizó en cuerpos de agua mediante transectos lineales de 100-300 m sobre la rívera. La extensión del transecto dependía de la densidad de la vegetación y la accesibilidad de la zona. Se tomaron datos de altitud, tipo de vegetación y coordenadas en

cada sitio. Cuando se obtenían organismos adultos, se realizaban mediciones morfométricas, así como fotografías de cada individuo.

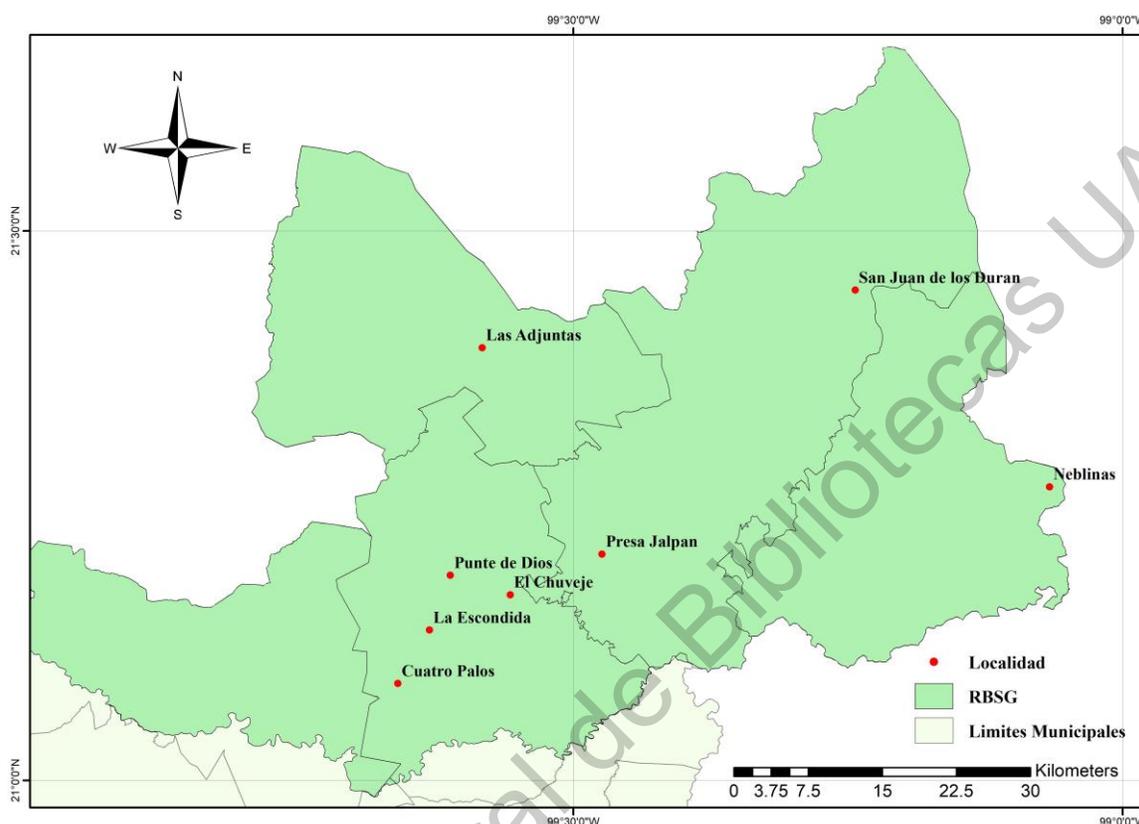


Figura 5.2.- Localidades de colecta de los anfibios dentro de la Reserva de Biósfera Sierra Gorda, del estado de Querétaro

Cuadro 5.1.- Características ambientales de los sitios de estudio. **RI:** Vegetación Riparia, **BPE:** Bosque *Pinus-Quercus*, **VS:** Vegetación Secundaria, **PI:** Pastizal Inducido, **RP:** Vegetación Riparia Perturbada.

Localidad	Municipio	Temperatura (°C)	Precipitación (mm)	Altitud (msnm)	Tipo de Vegetación	Cuerpo de Agua	Fecha de colecta
Punte de Dios	Pinal de Amoles	12-24	500-1000	1427	RI	Río	Jun, Jul, Nov 2018
La Escondida				BPE	Río	Dic. 2018	
El Chuveje				RP	Río	Jun. 2018	
Cuatro Palos				BPE	Poza natural	Dic. 2018	
Presa Jalpan	Jalpan de Serra	12-26	600-3100	783	VS	Presa	Nov. 2018
San Juan de los Duran				1491	PI	Poza natural	Ene. 2019
Las Adjuntas	Arroyo Seco	16-24	600-900	617	RP	Poza natural	Oct. 2018
Neblinas	Landa de Matamoros	12-24	600-1300	820	RI	Río	Oct. 2018

La colecta de los organismos (estadio larval, juvenil y adulto) se hizo de junio del 2018 a enero del 2019. Para este estudio se consideró el estadio larval como el organismo que presentan cola y sin patas delanteras desarrolladas (Figura 5.3); el estadio juvenil, como organismos que presentaban patas delanteras y traseras, pero que mantenían la cola (Figura

5.4); y finalmente el estadio adulto, como organismos con patas delanteras y traseras bien desarrolladas y ausencia de cola (Figura 5.5).

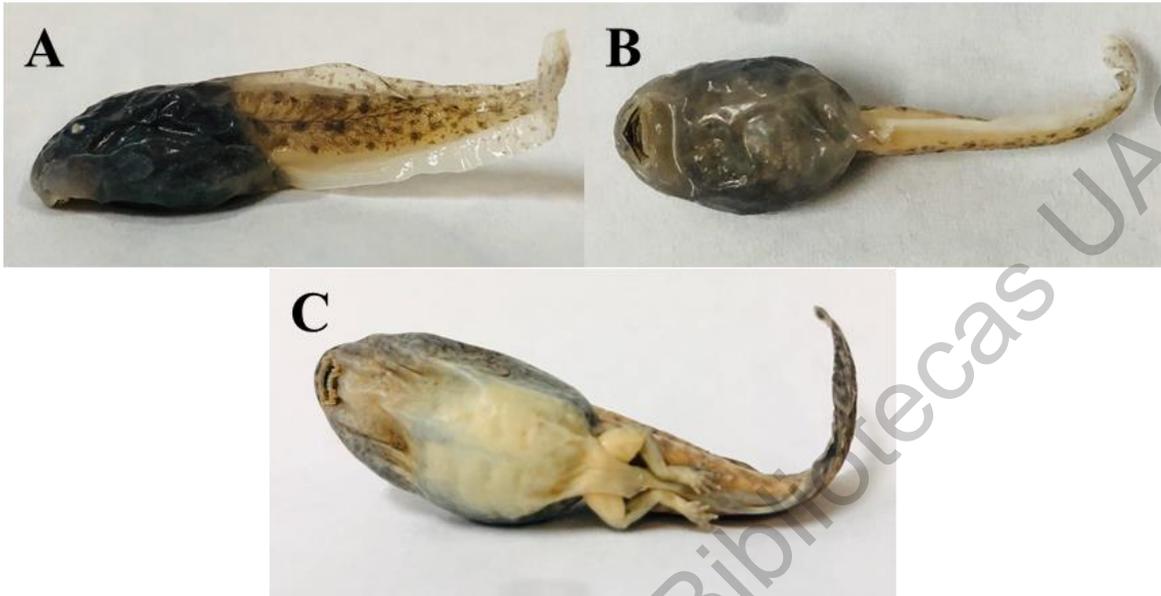


Figura 5.3.- Larvas (renacuajos) de *Ecnomiohyla miotympanum* (Hylidae): **A)** imagen lateral de un organismo larval, **B)** imagen ventral, organismo larval sin desarrollo de las patas traseras. *Lithobates berlandieri* (Ranidae): **C)** imagen ventral, organismo larval de con desarrollo de patas traseras.



Figura 5.4.- Estadio juvenil de *Ecnomiohyla miotympanum* (Hylidae). **A)** imagen lateral de un organismo juvenil, **B)** imagen ventral, organismo juvenil con desarrollo de patas delanteras con presencia de cola.



Figura 5.5.- Estadios adultos. **A)** *Lithobates berlandieri* (Ranidae), **B)** *Incilius nebulifer* (Bufonidae).

En cada localidad se capturaron de dos a seis organismos en estadio larval (dependiendo de la densidad y la presencia); para los estadios juvenil y adulto se capturó un máximo de tres organismos utilizando una red manual (Figura 5.6). Solo algunos individuos de los primeros estadios (larval y juvenil) se sacrificaron con alcohol al 70% y se mantuvieron en hielo hasta llegar al laboratorio, donde se pasaron a resguardo en refrigeración a -20°C hasta su disección. Una parte de los organismos colectados (2-3 individuos) se utilizaron para los procedimientos moleculares, mientras la otra parte (2-3 individuos) se resguardaron en la Colección Húmeda de Anfibios de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro.



Figura 5.6.- Colecta de organismos con red manual. Imagen tomada por Andrea

A los anuros adultos que fueron capturados se les tomaron hisopados bucales (Figura 5.7). La técnica consistió en introducir cuidadosamente un hisopo estéril en la cavidad oral, y hacer movimientos circulares para obtener células del recubrimiento oral. Los hisopos se almacenaron en crioviales estériles con alcohol al 70% y se mantuvieron en hielo hasta pasarlos a refrigeración -20°C , para su posterior procesamiento (Pidancier et al., 2003). Adicionalmente a los ejemplares se les tomó fotografías y se identificaron hasta familia (Flores-Villela et al., 1995)



Figura 5.7.- Toma de las muestras de hisopados bucales de *L. berlandieri* (Izquierda), mediciones realizadas para la identificación a familia (Hilydae)(derecha).

5.2 Trabajo de laboratorio

5.2.1 Extracción de ADN

De los individuos colectados para la extracción de ADN se usó la musculatura caudal de la cola, el músculo *gracilis mayor* de la pata o un conjunto de individuos de la misma muestra cuando el material genético no alcanzaba los 25 mg recomendados por el kit de extracción. La extracción de ADN se llevó a cabo mediante un kit comercial (Quiagen DNeasy Blood & Tissue® (Cat No./ID: 69504), siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 1), siguientes modificaciones:

- 1) Se maceró con una aguja de disección el tejido junto al buffer de lisis.
- 2) Los hisopos se cortaron y se removió el tubo de plástico mientras que el algodón se separó en hebras y se colocó con el buffer de lisis.
- 3) Los tejidos se mantuvieron en lisis y proteinasa K durante 12 horas a 60° C.

Se realizaron dos pruebas previas para comprobar que la cantidad de ADN fuera suficiente y con una pureza aceptable. Esto se verificó la medición de absorbancia con una espectrofotometría (Nanodrop®). Una vez confirmado estos datos, se realizó la extracción de ADN de los demás ejemplares colectados.

5.2.2 Estandarización y amplificación por PCR punto final

Para la estandarización de la amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) punto final se hizo una comparación entre tres enzimas con dos diferentes programas de amplificación, utilizando los mismos oligonucleótidos descritos por Palumbi et al. (2002). Los oligonucleótidos se describen en el Cuadro 5.2. Las tres enzimas utilizadas fueron Phusion Hot Start II DNA Polymerase Thermo Scientific®, GoTaq Flexi DNA Polymerase de PROMEGA® y Master Mix Green Taq polimerasa de PROMEGA®. Todos los experimentos se hicieron con un volumen final de 25 µL y con el ADN extraído. Las descripciones de las mezclas utilizadas para cada enzima se muestran en el Anexo 2. Los programas de amplificación utilizados fueron descritos por Rovito S. (Comp. Pers, 2019, Mccranie & Rovito 2014) y Sandoval et al. 2017) los cuales se utilizan para salamandras (Cuadro 5.3); el segundo programa de amplificación fue descrito por (Gunther et al. 2016)

y es utilizado para renacuajos (Cuadro 5.4). Se utilizó un control negativo y uno positivo (muestra de tejido de salamandra), la muestra utilizada para la estandarización fue de tejido muscular de la cola de *Ecnomiohyla miotimpanum* en estadio larval (AM7).

Cuadro 5.2.- Oligonucleótidos descritos por Palumbi et al. 2002 para amplificar la región 16s ARN ribosomal de anfibios.

Regio/Gen	Secuencia	Producto
16s ribosomal	5 'CGCCTGTTTATCAAAAACAT 3'	600-650
	5 'CCGGTCTGAACTCAGATCACGT 3'	

Cuadro 5.3.- Programa de amplificación utilizado por Rovito et al. (2019) para la amplificación de la región 16s ribosomal de los anfibios.

Proceso del ciclo	Número de ciclos	Temperatura	Tiempo (minutos)
Desnaturalización inicial del DNA	1	94°C	02:00
Desnaturalización del DNA	38	94°C	00:30
Alineación de los oligonucleótidos	38	48°C	01:00
Extensión	38	72°C	01:00
Extensión final	1	72°C	07:00
Conservación del producto obtenido	∞	4°C	Tiempo indefinido

Cuadro 5.4.- Programa de amplificación utilizado por Gunther et al. (2016) para la amplificación de la región 16s ribosomal de los anfibios.

Proceso del ciclo	Número de ciclos	Temperatura	Tiempo (minutos)
Desnaturalización inicial del ADN	1	94°C	02:00
Desnaturalización del ADN	40	94°C	00:30
Alineación de los oligonucleótidos	40	49°C	00:30
Extensión	40	72°C	01:00
Extensión final	1	72°C	10:00
Conservación del producto obtenido	∞	4°C	Tiempo indefinido

5.2.3 Cuantificación y visualización de ADN de los productos de PCR en geles de agarosa

La cuantificación y pureza de ADN extraído se llevó a cabo mediante la espectrofotometría utilizando el Nanodrop® modelo 2000c (Thermo Scientific®). Para la verificación de la integridad de los productos del PCR se preparó un gel de agarosa al 2%. Se cargaron 5 µl del marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Promega®) y 2 µl de búfer de carga

6X Orange DNA Loading Dye (ThermoScientific Inc.) adicionado GelRed Nucleic Acid Stain 10 000 X (Biotium) diluido 1:10 000. Los productos de PCR (amplificación) se cargaron 5 µl de muestra del producto y 3 µl de búfer de carga con GelRed, como se indica arriba. Los geles de agarosa se corrieron en una cámara de electroforesis horizontal, utilizando el búfer Tris-Acetato-EDTA (TAE) grado molecular (PROMEGA) a 1X, a 75 V durante 40 minutos. Posteriormente se visualizaron mediante exposición a luz UV en el fotodocumentador Gel Doc XR Gel Documentation System (Bio-Rad Laboratories) utilizando el programa Quantity One (Bio-Rad Laboratories).

5.3 Análisis de datos

5.3.1 Análisis molecular

Los productos del PCR obtenidos se limpiaron y mandaron a secuenciar a la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología (UNAM, Campus Juriquilla).

Para determinar la identidad taxonómica de las secuencias de la RBSG, se alinearon mediante el programa en línea BLAST 2.10.0 (NCBI) (Madden et al., 1996) para determinar el porcentaje de similitud respecto a otras secuencias previamente reportadas. Adicionalmente, se obtuvieron las distancias genéticas inter e intraespecíficas de las secuencias, para corroborar la identidad taxonómica en el que se compararon con las secuencias de referencias obtenidas del BLAST y las obtenidas en el GenBank. Para este análisis primero se calculó la variación interespecífica, alineando las secuencias usando ClustalX (Thompson et al. 1997). Las secuencias de la matriz de datos con una extensión de 528 pb. Esta matriz estuvo conformada por las secuencias obtenidas en este estudio, secuencias del GenBank y una secuencia de *Eleutherodactylus verrucipes* como grupo externo. Se construyó un árbol Neighbor Joining (NJ) usando el modelo de distancia Kimura 2-parameter (K2P) con 1000 réplicas de bootstrap (Fouquet et al., 2007). Las distancias genéticas por pares (DGP) fueron calculadas utilizando el programa MEGA X (Kumar et al. 2018) al igual que la alineamiento y la construcción del árbol. Se utilizó el valor umbral descrito por Fouquet et al. (2007) del 3% para la asignación específica final.

Finalmente se obtuvo la variación intraespecífica, de acuerdo a los grupos obtenidos de la del análisis anterior, estas matrices estaban formadas por las muestras del estudio con sus

respectivas secuencias del GenBank y un máximo de dos grupos externos (especies hermanas) (Cuadro 5.5). De igual manera se realizaron los arboles NJ y el análisis DGP para cada matriz.

Cuadro 5.5.- Secuencias de anuros obtenidas de Genbank para los grupos externos del análisis intraespecífico. **Pb:** Pares de bases.

Familia	Especie	Taxon emparentado	Localidad	pb	# Acceso GenBank 16S	Referencia
Hylidae	<i>E. miotypanum</i>	<i>Ecnomiohyla miliaria</i>	Panama: Provincia Cocle	570	FJ784360.1	Wiens et al. 2010.
Ranidae	<i>L. berlandieri</i>	<i>Lithobates neovolcanica</i>	Mexico: Michoacan	1958	AY779236.1	Hillis & Wilcox. 2005
		<i>Lithobates tlaloci</i>	Mexico: Distrito Federal	1959	AY779234.1	
	<i>I. nebulifer</i>	<i>Rhinella marinus</i>	Mexico: Veracruz	545	DQ415553.1	Mendelson et al. 2011
Bufonidae	<i>R. horribilis</i>	<i>Rhinella schneideri</i>	Brazil	586	JQ627201.1	Maciel et al. 2010
		<i>Rhinella jimi</i>	Brazil	1911	GU178795.1	

5.3.2 Datos geográficos y estado de conservación

Una vez obtenidas las identidades taxonómicas de los anuros colectados, se procedió a buscar información sobre distribución geográfica usando la plataforma en línea Global Biodiversity Information Facility (GBIF por sus siglas en ingles). Sólo se consideró la información para nuestro país, que fueran localidades y de observaciones con coordenadas. Para caracterizar su distribución en la RBSG de cada especie se hizo un mapa usando los datos de los sitios de muestreo y los del GBIF utilizando el programa ArcMaps 10.5 (ESRI, 2020). Adicionalmente, se utilizó la plataforma en línea La Lista Roja de Especies Amenazadas de la IUCN (2019) y la NOM-059-SEMARNAT-2010 para obtener el estado de conservación para cada una de las especies obtenidas para el estudio.

VI. RESULTADOS

6.1 Obtención de muestras

En total se obtuvieron 23 muestras de las ocho localidades muestreadas. La mayor parte de los organismos capturados se encontraban en estadio larval (11 individuos), seguidos del estadio adulto (8 individuos) y solo se encontró cuatro individuos en estadio juvenil (Figura 6.1). Se procesaron 15 muestras de tejido muscular (larvas y juveniles) y 8 de hisopados (adultos). Con un total de 10 muestras (tejido e hisopados), Puente de Dios fue la localidad con el mayor número de muestras. En el resto de las localidades solo se pudo obtener muestras de tejido o de hisopados en algunos casos (Anexo 3).

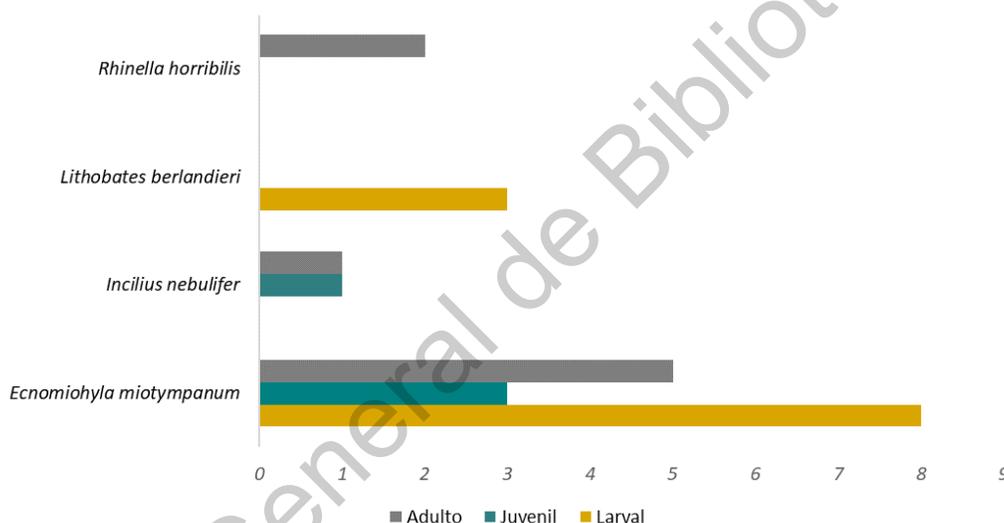


Figura 6.1.- Número de individuos capturados por estadio.

6.2 Técnica molecular.

6.2.1 Estandarización de la técnica de PCR punto final

En la estandarización se observó que el programa descrito por Gunther et al. (2016), no tuvo resultados concluyentes con las enzimas utilizadas (Figura 6.2), tanto la Master Mix como la Phusion Hot tuvieron un gran número de bandas no específicas, mientras que la enzima GoTaq tuvo un número menor de bandas no específicas, a pesar de tener una banda muy bien delimitada, está se ubica por arriba del tamaño de banda (700-800 pb) que se busca (600-650 pb). En contraste, el programa descrito por Rovito et al. (2019), tuvo un

resultado concluyente con la enzima Master Mix (Figura 6.3), con la cual se observó bandas específicas entre los 600-650 pb, a diferencias de la enzima Phusion Hot que se observó un gran número de bandas. La enzima GoTaq de igual manera tuvo una banda específica en el tamaño deseado, pero también se observan bandas no específicas por arriba y debajo de los 600 pb.

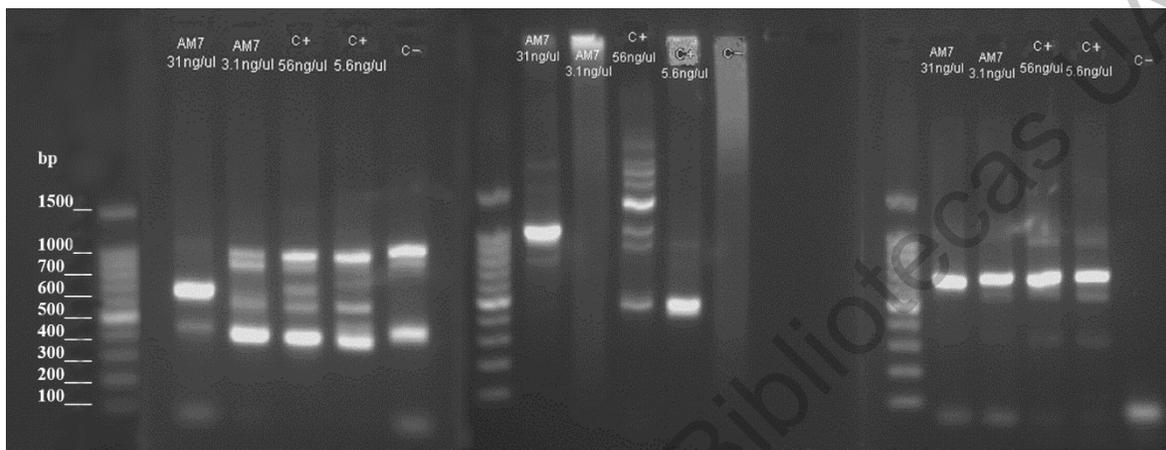


Figura 6.2.- Geles de la electroforesis del PCR de punto final con la comparación entre las enzimas con el programa de Gunther et al. (2016). Master Mix Green Taq de PROMEGA (Izquierda), Phusion Hot de Thermo Scientific (Centro) y GoTaq Flexi de PROMEGA (derecha).

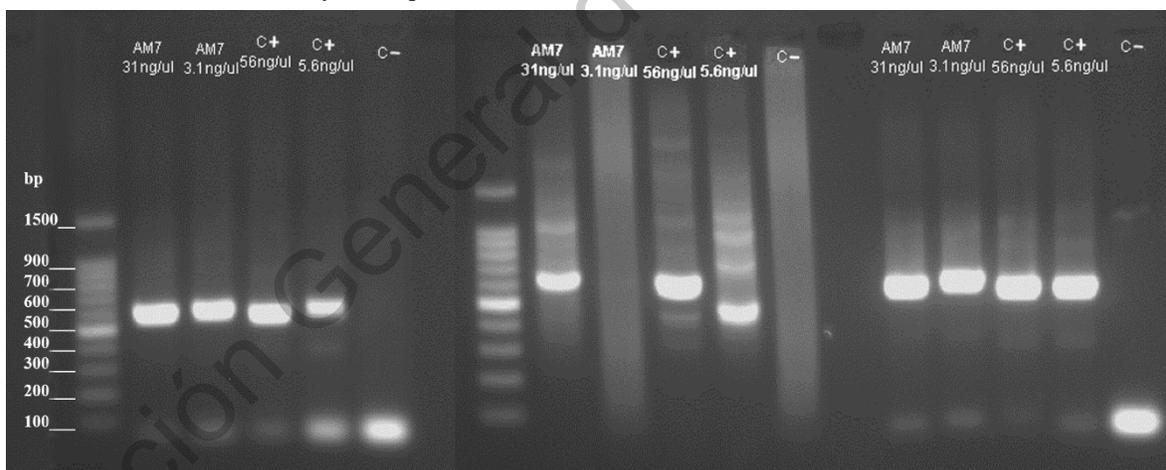


Figura 6.3.- Geles de la electroforesis del PCR de punto final con la comparación entre las enzimas con el programa de Rovito et al. (2019). Master Mix Green Taq de PROMEGA (Izquierda), Phusion Hot de Thermo Scientific (Centro) y GoTaq Flexi de PROMEGA (derecha).

Las muestras se procesaron de acuerdo a los resultados anteriores, los cuales revelan que la mejor enzima fue Master Mix con el protocolo descrito por Rovito et al. (2019) Como se observa en la Figura 6.4, las bandas obtenidas oscilaban entre los 600 y 650 pb. Las muestras que no amplificaron se corroboraron de nuevo para evitar falsos negativos.

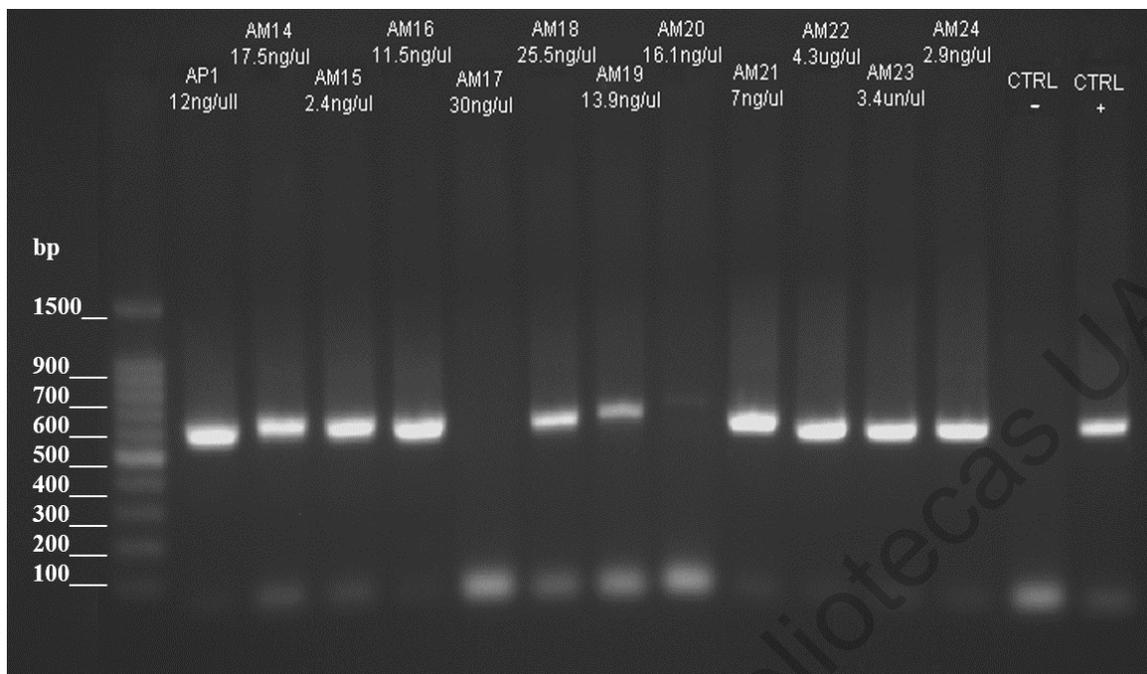


Figura 6.4.- Electroforesis del PCR de punto final con algunas de las demás muestras procesadas, utilizando la enzima Master Mix Green Taq de PROMEGA y el programa descrito por Rovito et al. (2019).

6.2.2 Análisis moleculares e identidad molecular

Se obtuvieron secuencias del gen 16S de todas las muestras por lo que todos los genotipos fueron identificados y mostraron valores de porcentaje de identidad mayores al 98% con respecto al BLAST (Cuadro 6.1). A partir de estos porcentajes se obtuvieron las secuencias de referencia del GenBank (dos secuencias para cada una de las especies tentativas) que se incluyeron en los análisis de diferenciación (Cuadro 6.2). El árbol de NJ (Fig. 6.5 y 6.6) mostró nueve grupos, y de acuerdo a los valores umbral respecto a las secuencias de referencia se confirman la asignación taxonómica de las cuatro especies obtenidas por el BLAST.

Cuadro 6.1.- Familias y especies representados en los genotipos y su porcentaje de identidad.

Familia	Especie	No. Genotipos	% de identidad	% de cobertura
Hylidae	<i>Ecnomiohyla miotympanum</i>	16	98-99	90-97
Ranidae	<i>Lithobates berlandieri</i>	3	99	90-93
Bufonidae	<i>Incilius nebulifer</i>	2	99	91-97
	<i>Rhinella horribilis</i>	2	99	93

Cuadro 6.2.- Secuencias con un porcentaje de similitud mayor del 98% obtenidas en el análisis BLAST, utilizadas para el análisis de distancias genéticas por pares (DGP)

Familia	Taxon	Localidad	pb	# Acceso GenBank 16S
Hylidae	<i>Ecnomiohyla miotympanum</i>	Mexico: Puebla	2409	AY843645
	<i>Ecnomiohyla miotympanum</i>	Mexico: Veracruz	1869	MH004107.1
Ranidae	<i>Lithobates berlandieri</i>	Mexico, Coahuila	530	DQ019608.1
	<i>Lithobates berlandieri</i>	USA: TX: San Marcos	1961	AY779235.1
	<i>Incilius nebulifer</i>	USA: Texas, Gulf Coast	5254	HQ290945.1
Bufonidae	<i>Incilius nebulifer</i>	USA: Louisiana	567	MN135513.1
	<i>Rhinella marinus</i>	Mexico: Veracruz	545	DQ415553.1
	<i>Rhinella marinus</i>	Mexico: Veracruz	545	DQ415547.1

Entre el grupo 1 y 2 la variación es del 2.8% (Fig. 6.5) , este valor es menor al 3% descrito por Fouquet et al. (2007), lo que indica que estos dos grupos son la misma especie, de igual manera los grupos 3-4, 5-6 y 7-8 (Fig. 6.6), tuvieron una porcentaje de variación entre las muestras más parecidas es menores al 3% (1.2%, 0.67% y 0.77 % respectivamente) (Cuadro 6.3). Las diferencias interespecíficas entre se observan el respecto a la especie hermana, así como la variación intraespecífica que van desde el 10.6-35.77% (Anexo 4).

Cuadro 6.3.- Distancias genéticas interespecíficas entre grupos obtenidos del árbol de Neighbor-Joinins, expresadas en porcentaje. * Indican la comparacion entre los grupos que pertenecen a la misma especie menor del 3% .

	Gp1	Gp2	Gp3	Gp4	Gp5	Gp6	Gp7	Gp8	Gp9
Gp1	-								
Gp2	2.81*	-							
Gp3	27.92	28.02	-						
Gp4	28.20	28.09	1.20*	-					
Gp5	20.27	20.02	25.77	24.46	-				
Gp6	19.84	19.35	24.83	24.71	0.67*	-			
Gp7	20.98	21.22	24.28	23.43	10.82	10.83	-		
Gp8	20.49	20.27	23.34	23.67	10.72	10.02	0.77*	-	
Gp9	29.45	29.63	36.09	35.28	33.1	33.45	33.11	33.4	-

El grupo de *E. miotympanum* (gpo1-2) tiene valores intraespecíficos que van desde 0.01-2.6% de divergencia siendo la muestra MH004107 *E. miotympanum* el valor más alto, y la divergencia con el grupo externo va desde 15.4-17.2%. En el grupo de *L. berlandieri* se observó una divergencia del 0.01-0.58% entre las muestras, y del grupo externo 3.18-3.58%. El grupo *I. nebulifer* obtuvo una divergencia intraespecífica de las muestras del 0.01-0.18%, en contraste con el grupo externo del 9.69-9.91%. Finalmente, el grupo *R. horribilis* mostro una divergencia entre las muestras del 0.01-0.99%, mientras que las

especies hermanas tuvieron una divergencia del 4.28-5.77% (Cuadros y árboles en Anexo 4).

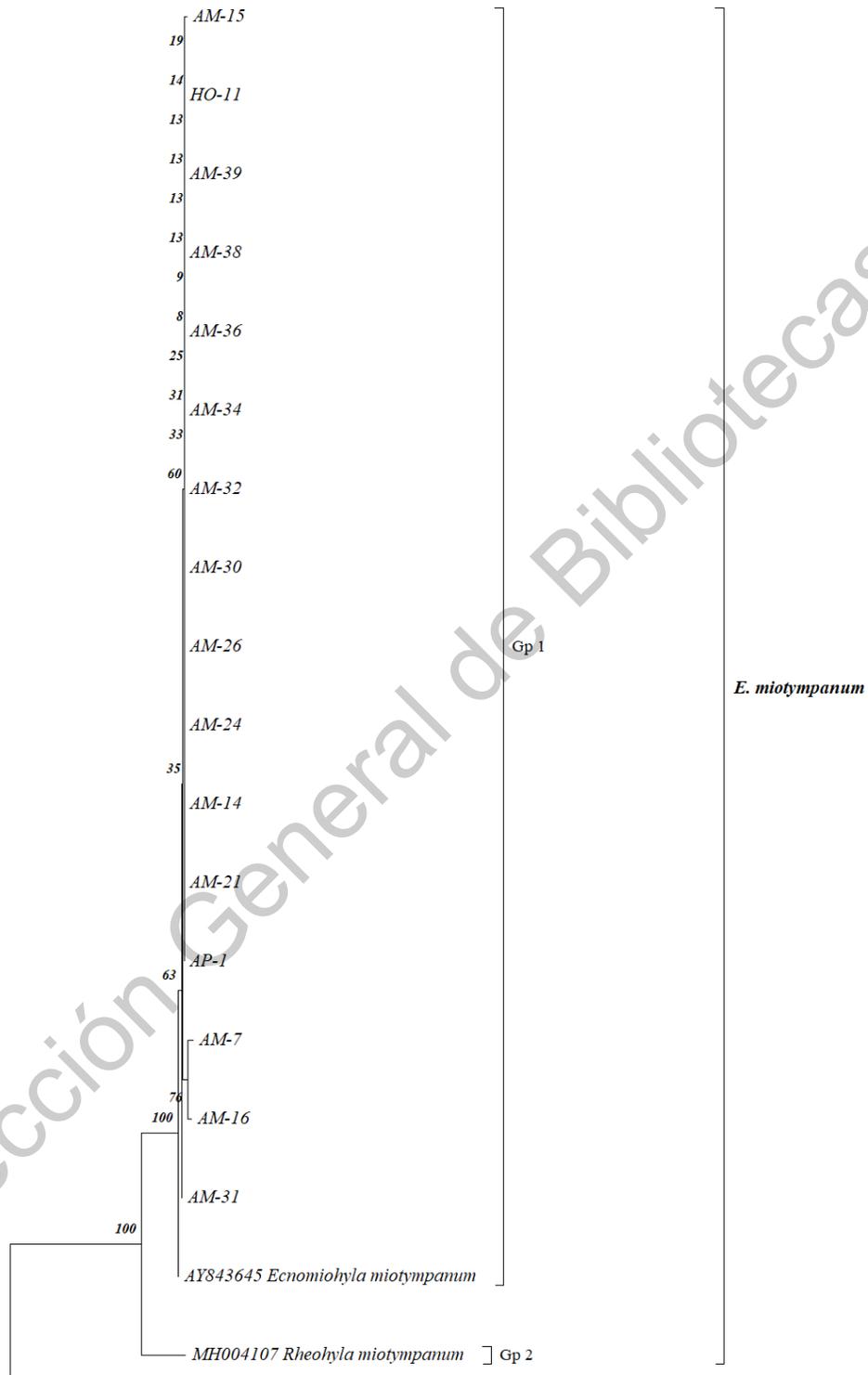


Figura 6.5.- Parte superior del árbol Neighbor Joining usando el modelo de distancia Kimura 2-parameter para el gen 16s. Se observa el grupo *E. miotympanum* compuesto por el grupo uno y dos

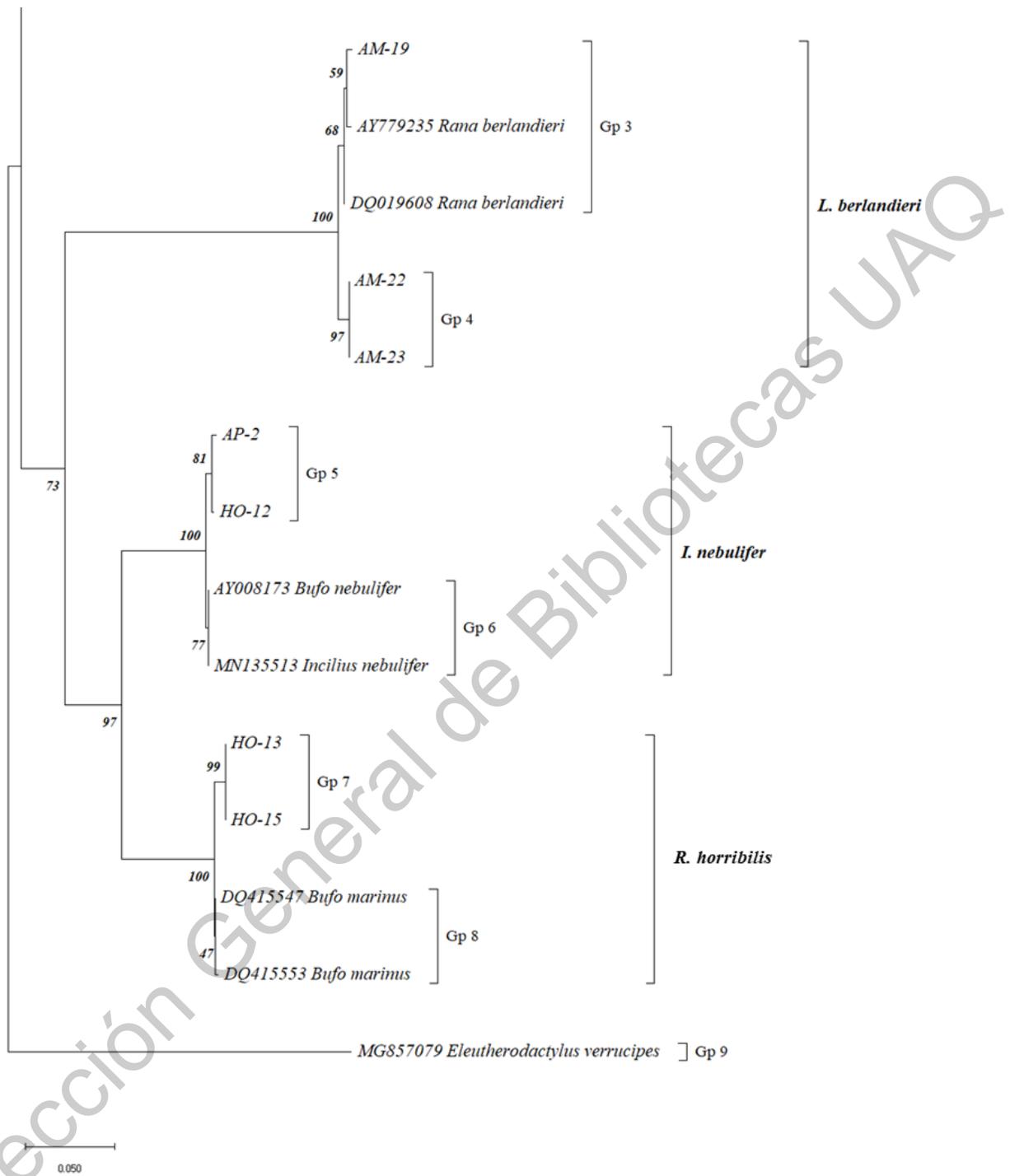


Figura 6.6.- Parte inferior del árbol Neighbor Joining usando el modelo de distancia Kimura 2-parameter para el gen 16s. Se observan los tres grupos restantes y la composición de los mismos.

Por su identidad taxonómica, la familia más abundante tanto por el número de especies como de individuos colectados fue la familia Hylidae con una especie (*Ecnomiohyla miotympanum*) y 16 individuos (el 70% de los individuos colectados), seguida por la familia Bufonidae con dos especies (*Incilius nebulifer* y *Rhinella horribilis*) y 4 individuos, y finalmente la familia Ranidae con una especie (*Lithobates berlandieri*) y tres individuos (Figura 6.7).

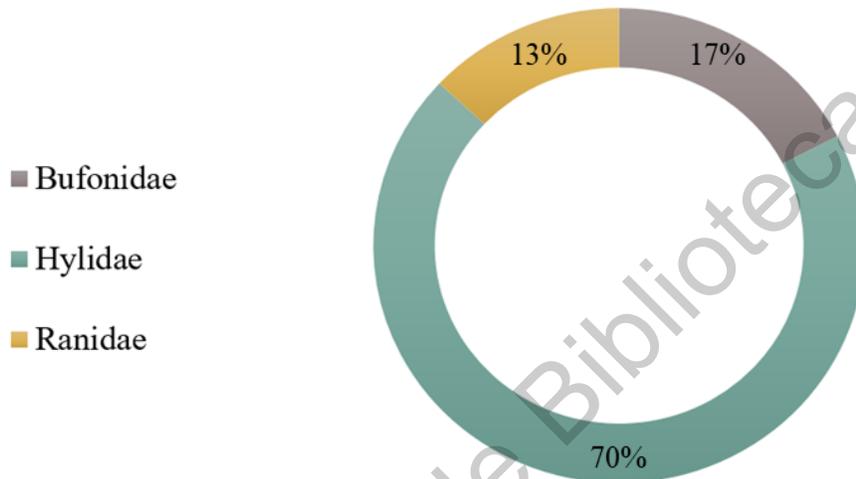


Figura 6.7.- Porcentaje de individuos por familia.

6.3 Distribución y estatus de conservación

6.3.1 Distribución en la RBSG

Por la información obtenida en GBIF, se reconoce una especie endémica para México (*E. miotympanum*), dos ampliamente distribuidas (*L. berlandieri* y *R. horribilis*) y una con distribución en México y EUA (*I. nebulifer*). Por su distribución local (Dixon et al., 1972; Montes-de-Oca, 1999; Dixon & Lemos-Espinal, 2010; Cruz-Elizalde et al., 2019) se reconocen seis nuevos sitios para las cuatro especies identificadas. Estas se ubican en tres municipios: 1) Pinal de Amoles (tres nuevas localidades), 2) Jalpan de Serra (dos nuevas localidades) y 3) Arroyo Seco (una nueva localidad) (Anexo 5).

La especie más abundante con 16 organismos colectados en diferentes estadios y ampliamente distribuida es *E. miotympanum* que se encontró en cinco de los ocho sitios muestreados (Figura 6.8), estos lugares son principalmente ríos que se mantienen conservados, aunque el aumento del turismo en estos sitios puede ser un factor importante de riesgo, el único sitio que no se mantiene conservado es La escondida, además de que se encuentra muy cerca del pueblo de Pinal de Amoles, lo que implica que tiene alto riesgo por la urbanización de la zona. El resto de las especies no tuvieron densidades mayores a dos organismos colectados (en cualquier estadio) y su distribución fue puntual (Cuadro 6.4). En el Chuveje y en Neblinas ya se había registrado alguna de las especies identificadas (Figura 6.9,6.10,6.11).

Cuadro 6.4.-Localidades que amplían la distribución en la RBSG de los anuros identificados en este trabajo para cada una de las especies reportadas, *: Localidades con registros ya conocidos para las especies encontrada.

Localidad	Municipio	Lat	Long	Especies
Cuatro Palos	Pinal de Amoles	21.088426	-99.659506	<i>E. miotympanum</i>
El Chuveje *	Pinal de Amoles	21.169056	-99.557371	<i>E. miotympanum</i>
La Escondida	Pinal de Amoles	21.13701	-99.63085	<i>E. miotympanum</i>
Las Adjuntas	Arroyo Seco	21.393861	-99.582772	<i>I. nebulifer</i>
Neblinas *	Landa de Matamoros	21.267319	-99.066618	<i>E. miotympanum</i>
Presa Jalpan	Jalpan de Serra	21.20612	-99.473988	<i>R. horribilis, I. nebulifer</i>
Puente de Dios	Pinal de Amoles	21.1868	-99.611833	<i>E. miotympanum, L. berlandieri</i>
San Juan de los Duran	Jalpan de Serra	21.44625	-99.243528	<i>L. berlandieri</i>

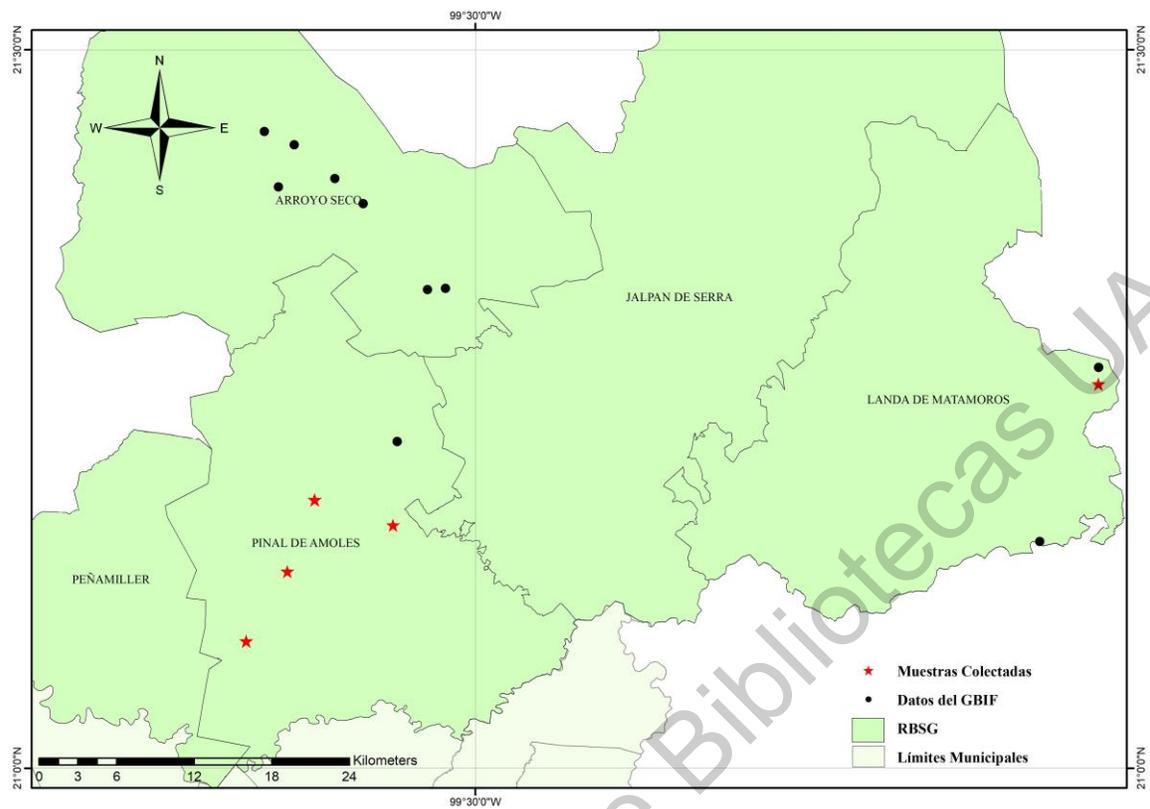


Figura 6.8.- Distribución de *Ecnomihyla miotympanum* en el estudio y datos del GBIF.

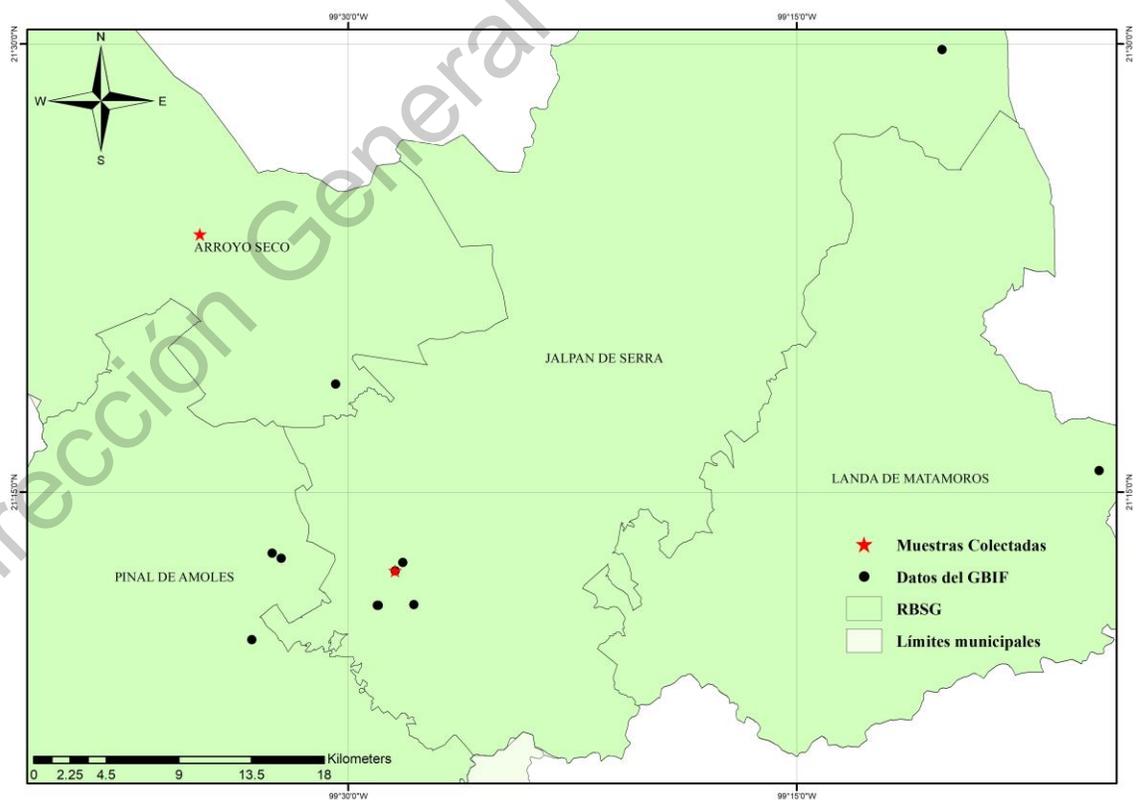


Figura 6.9.- Distribución de *Incilius nebulifer* en el estudio y datos del GBIF.

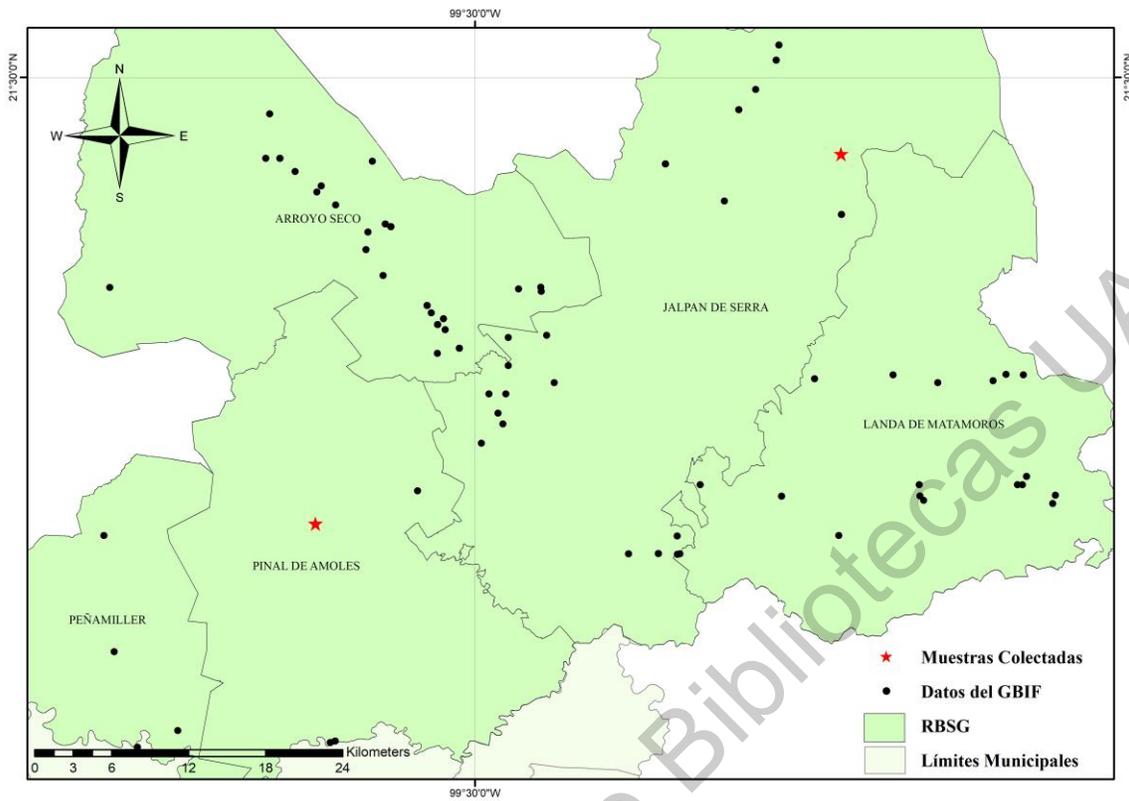


Figura 6.10.- Distribución de *Lithobates berlandieri* en el estudio y datos del GBIF.

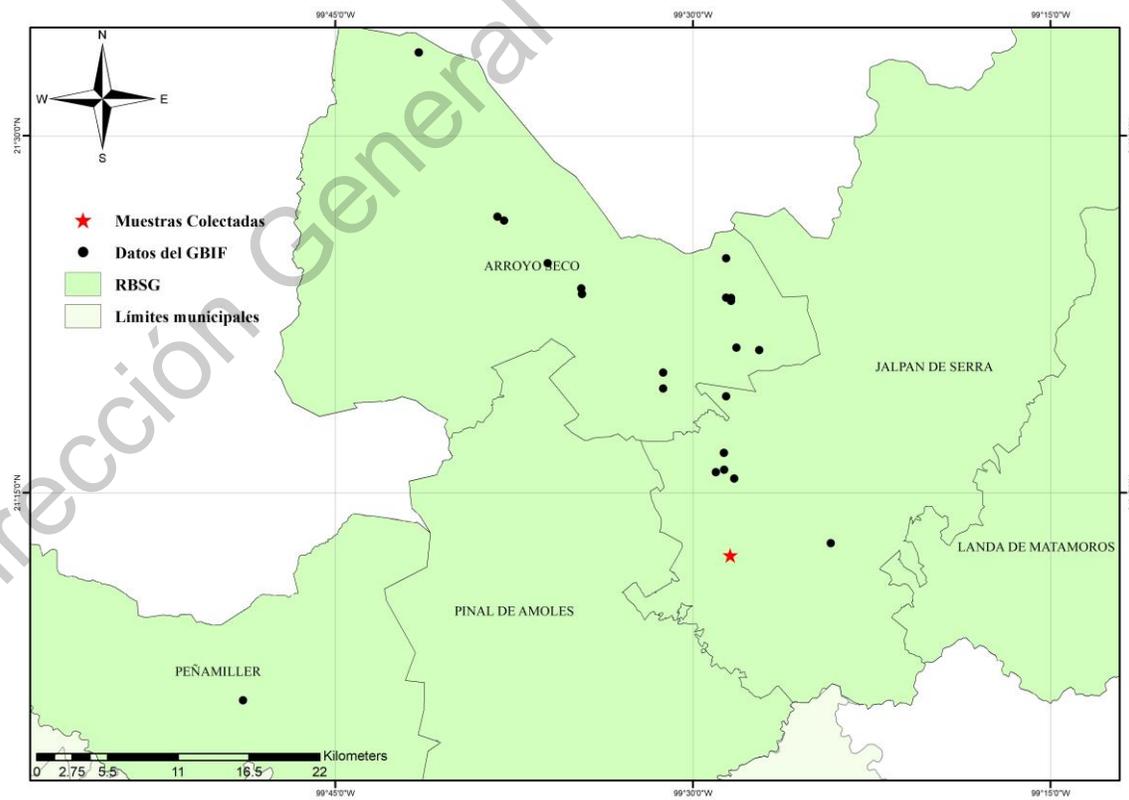


Figura 6.11.- Distribución de *Rhinella horribilis* en el estudio y datos del GBIF.

6.3.2 Estatus de Conservación

De acuerdo con la IUCN (2019) todas las especies encontradas están catalogadas como especies de *preocupación menor* y *casi amenazado* (Cuadro 6.5). En esta última categoría sólo se encuentra la endémica *E. miotympanum* para México. Por otra parte, en la NOM-059-SEMARNAT-2010 solo se enlista a *L. berlandieri*. en la categoría de *amenazada* (SEMARNAT, 2010) (Anexo 6). Dentro de la Reserva podemos encontrar algunos factores importantes y alarmantes que pueden ser perjudiciales para estas especies, principalmente la pérdida del hábitat (La Escondida, San Juan de los Duran, Las Adjuntas, Cuatro Palos y Puente de Dios), el descargue de agua residuales en ríos (Neblinas, Presa Jalpan), el aumento masivo del turismo a las áreas de reproducción de *E. miotympanum* (Puente de Dios, Las Adjuntas, El Chuveje y Cuatro Palos). Estos factores de riesgo encontrados en estas localidades tienen que ser atendidos para poder asegurar la permanencia de estas y muchas más especies de anuros.

Cuadro 6.5.- Listado de especies y familias y su categoría de riesgo. Categoría IUCN, **LC**: Preocupación menor, **NT**: Casi amenazado. SEMARNAT-2010, **NS**: Sin estatus; **Pr**: Sujeta a protección especial.

ESPECIE	Categoría SEMARNAT	
	IUCN	2010
Orden Anura		
Familia Bufonidae		
<i>Incilius nebulifer</i> (Wiegmann, 1833)	LC	NS
<i>Rhinella horribilis</i> (Linnaeus, 1758)	LC	NS
Familia Hylidae		
<i>Ecnomihyla miotympanum</i> (Cope, 1863)	NT	NS
Familia Ranidae		
<i>Lithobates berlandieri</i> (Baird, 1854)	LC	Pr

VII. Discusión

7.1 Técnicas moleculares e identificación molecular

De acuerdo a los resultados obtenidos se pudo observar que con el protocolo de Gunther et al. (2016) se obtuvieron bandas inespecíficas de alto y bajo peso molecular, lo que refleja la falta de especificidad de los oligos, lo que pudo deberse a las enzimas utilizadas, ya que el mismo autor describe que se utilizó una Taq polimerasa (PeqLab), la cual no se utilizó en este estudio. En cambio, con el protocolo descrito por Rovito et al. (2019) se tuvo un mejor resultado con dos enzimas, a pesar de ser un protocolo utilizado para amplificar ADN de caudados. Sin embargo, los cebadores descritos por Palumbi et al. (2002) que se utilizaron tanto en este estudio como en los estudios realizados por Rovito, fueron obtenidos utilizando el organismo modelo *Xenopus laevis* (Orden Anura), indicando así que el gen 16s es un gen conservado que se comparte en todos los órdenes, pero que a su vez tienen mutaciones puntuales que permiten distinguir entre especies (Wang et al., 2000).

7.1.1 Identificación molecular

Las distancias genéticas por pares (DGP) interespecífica obtenida, han confirmado que los grupos definidos en el árbol Neighbor Joining (NJ) (Fig. 15 y 16), son especies diferentes, ya que los valores están por arriba del umbral del 3% sugerido por Fouquet et al. (2007), el valor más bajo (10.6%) se observa entre especies pertenecientes a la misma familia (Bufonidae), estos valores a su vez podrían deberse a que *I. nebulifer* y *R. horribilis*, son especies cercanas (Mendelson et al., 2011). Mientras que el valor más alto (35.77%) lo tienen *L. berlandieri* y *E. verrucipes*, la divergencia tan alta entre estas dos especies podría deberse a que la familia Eleutherodactylidae es más basal (originada a principios del paleógeno), a diferencia de la familia Ranidae, la cual está considerada como una familia de origen mucho más reciente (originada a finales del paleógeno) (Feng et al., 2017).

Los valores intraespecíficos para cada uno de los grupos, no fueron mayores al 3% lo que nos indica que las muestras y las secuencias de referencia del GenBank son la misma especie. En el caso del grupo *E. miotypanum*, las muestras tienen valores de similitud 0.01-0.95% (Anexo 4). Los valores más altos (>0.90%) pertenecen a las muestras AM-7 y AM-16 colectadas en el municipio de Landa de Matamoros, mientras que las demás

muestras son del municipio de Pinal de Amoles por lo que la distancia geográfica puede indicar que se trate de poblaciones distintas. Como ya se había señalado, la muestra del GenBank MH004107 de *E. miotympanum* tuvo los valores similitud intraespecíficos más altos de este grupo en el análisis. Esta muestra fue colectada en el estado de Veracruz (Faivovich et al., 2018) y aunque hasta el momento no existen estudios poblacionales para este especie, pero los resultados indican que existen diferencias genéticas importantes dentro de las poblaciones en una escala geográfica mayor. Esta podría ser una línea de investigación importante para estudios de sistemática y filogeografía, e interesante por tratarse de una especie endémica de México y catalogada en riesgo (Santos-Barrera et al., 2004) (Anexo 4).

I. nebulifer se observan valores interespecíficos entre 0.01-0.18% para las muestras y las secuencias del GenBank, confirmando que pertenecen a la misma especie (Fouquet et al., 2007). La variación observada entre este grupo con el grupo externo (*Rhinella marina* DQ415553) no supera el 10%, como ya se había observado en los valores interespecíficos. *R. horribilis* los valores de variación genética no supera el 0.01% entre las muestras, mientras que, si se comparan con las secuencias del GenBank este valor se incrementa a 0.77%, de igual manera podrían deberse a que son poblaciones diferentes, ya que las secuencias del GenBank fueron muestreadas en el estado de Veracruz (Mulcahy et al., 2006). Los valores de diferenciación genética respecto a otros bufónidos varían de 4.28-5.77% (Anexo 4). (Medeiros et al., 2010; Vallinoto et al., 2010; Sequeira et al., 2011; Acevedo et al., 2016).

L. berlandieri tiene valores bajos entre las muestras y la secuencias del GenBank (0.01-0.58%), aunque respecto a otras especies de *Lithobates* es mayor al 3% (3.18-3.85%) (Anexo 4). Estos resultados confirman las muestras de *L. berlandieri* corresponden a dicha especie y no a otras como *Rana neovolcanica* y *Rana tlaloci* que pertenecen al complejo de especies *Rana pipiens*. Este complejo comprende alrededor de 20 especies, las cuales están distribuidas desde el este y centro de Estados Unidos hasta el centro de Panamá. Este complejo se distingue por poseer una morfología externa muy conservada, lo que ha provocado dificultades en poder delimitar sus especies (Zaldívar-Riverón et al., 2004). Por lo que los métodos moleculares están sirviendo de ayuda para la identificación taxonómica de anuros de la Reserva.

7.1.2 Identificación molecular de larvas

El estadio larval fue un parte importante para el estudio, puesto que representó el 49% de los organismos capturados. El alto porcentaje de captura podría estar asociado a su baja movilidad, época del año y a su fácil captura (Parmelee et al., 2002). Estas cualidades hacen que las larvas sean un buen objeto para la identificación molecular, ya que en algunos periodos del año es la única evidencia de la presencia de muchas especies tanto comunes como raras. La identificación morfológica de este estadio es complicada, porque la etapa adulta es muy divergente de la etapa larval (similares a los problemas con larvas de insectos holometábolos) y es difícil visualizar las piezas bucales, necesarias también para la identificación (Vences et al., 2005a). El uso de técnicas moleculares para la identificación de este estadio ha facilitado este proceso, y nuestro estudio está acorde con otros estudios en donde se han identificado renacuajos con éxito (Vences et al., 2005a; b; Grosjean et al., 2015; Gunther et al., 2016). Esta es una herramienta rápida para el estudio de las comunidades con la consideración de que se ha observado que la alta variabilidad mitocondrial de los anfibios puede provocar una incorrecta identificación, principalmente cuando las secuencias con las que se comparan son de orígenes geográficos diferentes (Vences et al., 2005a). Pero en áreas pequeñas como la RBSG ha sido de utilidad de la identificación molecular de los anfibios.

7.1.3 Hisopados bucales

Como se ha comentado anteriormente las poblaciones de anuros en el mundo van a la baja, es por ello que se tienen que utilizar muestreos que no impliquen el sacrificio de los organismos reproductivos de la población (estadio adulto), por esta razón, en este estudio se utilizó el muestreo con hisopados bucales. Esta técnica es no invasiva y no destructiva, a comparación de la remoción de una falange o el sacrificio del individuo (Pidancier et al., 2003; Goldberg et al., 2003; Broquet et al., 2007; Müller et al., 2013). Con los resultados obtenidos esta técnica demostró obtener la cantidad necesaria de tejido para realizar las pruebas moleculares. Müller et al. (2013) demostró que este método puede ser complicado de aplicar si los organismos son pequeños y vulnerables, proponen que utilizar frotis de hisopados externos y cloacales son igual de efectivos que los bucales y son más fáciles realizar, ya que introducir el hisopo en la cavidad bucal puede ser complicado. Si bien en

este estudio los organismos que se muestrearon no presentaron problema en la introducción del hisopado, la técnica de Müller et al. (2013) puede ser aplicada en individuos o especies pequeñas como por ejemplo *Eleutherodactylus verrucipes* o *Craugastor decoratus* que también se distribuye en la reserva.

7.1.4 Problemas taxonómicos de las especies

La especie *I. nebulifer* ha tenido varios problemas taxonómicos, ya que comparte características morfológicas muy similares a *I. valliceps*, y se cree que existen varios organismos en colecciones mal identificados (AmphibianWeb, 2020; Mendelson et al., 2015). Esta especie fue separada de *I. valliceps* por Mulcahy & Mendelson (2000), en cual se utilizó ADNmt de las poblaciones del norte y sur de México y EUA, y se observó que no eran conespecíficas, lo que llevo a los autores a retomar el nombre del taxón (*I. nebulifer*) que ya había sido descrita previamente por Girard (1854).

A su vez *L. berlandieri* ha tenido problemas taxonómicos (como ya se había comentado previamente) con *L. brownorum*, ya que esta especie fue originalmente descrita como una subespecie de *L. berlandieri* en la península de Yucatán y en la Sierra de Chiapas, pero fue ascendida a especie en el trabajo de Hillis et al. (1983) sin razón aparente, lo que deja en duda su validez taxonómica (Hillis et al., 1983; Zaldívar-Riverón et al., 2004). Finalmente *E. miotympanum* no se ha observado problemas taxonómicos (Faivovich et al. 2005).

El uso de técnicas moleculares junto a genes mitocondriales y nucleares, así como datos morfológicos pueden ayudar a resolver estos complejos de especies, por lo que es necesario continuar con estos estudios en los anuros para poder aclarar su identidad y relaciones taxonómicas (Hillis et al., 1983; Bradley & Macknight, 1996; Streicher et al., 2009; Vallinoto et al., 2010; Caminer & Ron, 2014; Santos et al., 2015; Xiong, Li, & Jiang, 2016).

7.2 Diversidad

Se tienen registradas 13 especies de anuros para la RBSG y en este estudio se encontraron cuatro de estas, lo que es un número bajo dada la alta diversidad en esta zona (CONANP, 2000). La poca riqueza encontrada puede deberse a los pocos muestreos realizados en la zona (un muestreo por mes), así como la temporalidad en las que se hicieron los muestreos

(finales de temporada de lluvias y principio de secas), estas condiciones solo nos permitieron observar una pequeña parte de la diversidad en la reserva.

En cuanto al número de organismos por especie, *E. miotympanum* tuvo el mayor número de organismos colectados esto podría deberse a que está considerada como una especie común (Duellman, 2001; Santos-Barrera et al., 2004) y a que se colectó la gran mayoría de estos organismos en el mes de julio, mes en el cual comienza su temporada de reproducción (Duellman, 2001). Las demás especies no tuvieron más de tres organismos colectados (tanto larvas, juveniles y adultos). En el caso de las especies de la familia Bufonidae, su baja densidad podría ser explicada a que estas especies tienen su pico de actividad en la noche (Stebbins & Cohen, 1997), y los muestreos se realizaron en la mañana y tarde antes de la puesta del sol.

Mientras la baja densidad de *L. berlandieri* puede deberse a dos factores importantes, la primera es que su época reproductiva va desde abril a julio, justo al final de la época reproductiva donde se comenzó los muestreos; y la segunda causa fue la dificultad de captura de esta especie (Chavez et al., 1995; Cedeño-Vázquez et al., 2000). Para estudios posteriores se recomienda realizar más muestreos durante la temporada de lluvias y con un esfuerzo de muestreo intensivo, tanto en las mañanas y en las noches para poder incluir el mayor número de organismos de varias especies a la vez.

Finalmente, se considera que el uso de técnicas moleculares, como las usadas en este trabajo, son esenciales para la conservación de la biodiversidad, principalmente en estudios de comunidades o monitoreo de especies, así como para especies endémicas. Para especies endémicas, ya que con estos datos podemos monitorear los cambios de la biodiversidad en el corto y largo plazo (Fouquet et al., 2007). Por lo que es fundamental que estas herramientas se tengan en consideración en los planes de manejo como en el de la RBSG para poder monitorear las poblaciones de anuros. De igual manera utilizar estas técnicas nos ayuda a conocer o descubrir especies crípticas, con el fin de poder delimitar sus poblaciones. Para que estas herramientas puedan funcionar adecuadamente, es necesario utilizar complementariamente herramientas filogenéticas, filogeográficas, morfológicas y ecológicas, ayudando así a comprender mejor a las especies y poblaciones en la región (Vences et al., 2005a; Fouquet et al., 2007; Vences et al., 2012).

VIII. Conclusión

Con base en los resultados de la estandarización de la técnica de PCR se concluye que los oligos utilizados, tuvieron un buen desarrollo en la amplificación del gen 16S mtADN tanto en muestras de hisopados como en muestras de tejido.

El protocolo que funcionó mejor para la extracción de material molecular fue el de Rovito et al. (2019). La enzima que funcionó mejor para este protocolo fue la Master Mix Green Taq de PROMEGA, la cual tuvo bandas mejor delimitadas y constantes en las pruebas.

En el estudio se obtuvieron 23 secuencias de anuros (tanto de adultos, juveniles y larvas) y todas se identificaron en un total de cuatro especies (*Ecnomiohyla miotympanum*, *Incilius nebulifer*, *Rhinella horribilis* y *Lithobates berlandieri*), de tres familias (Hylidae, Bufonidae y Ranidae). La corroboración de estos resultados mediante el análisis de sus distancias genéticas mostró una variación intraespecíficos de 0.01-2.6% e interespecíficos del 10.6-35.77%, que junto con el valor umbral del 3%, confirmaron la identidad taxonómica de las muestras obtenidas en este estudio.

La localidad con mayor número de individuos y con mayor riqueza colectados fue Puente de Dios del municipio de Pinal de Amoles. Aquí se colectaron 11 organismos de dos especies (*E. miotympanum* y *L. berlandieri*).

Todas las especies identificadas están en alguna categoría de riesgo. La especie con el mayor número de individuos y la de distribución más amplia fue la endémica *E. miotympanum*. La especie más escasamente colectada y con menor distribución fue *R. horribilis*.

El uso de técnicas moleculares es factible para conocer la diversidad y las poblaciones de anuros dentro de la RBSG. Se recomienda que en estudios posteriores se haga un muestreo más intensivo y que se siga usando la técnica de hisopados para no afectar a las poblaciones de anuros. Adicionalmente se podrían usar más genes como 12S, COI para poder tener un panorama genético más preciso y así delimitar mejor a las poblaciones para poder enfocar mejor los esfuerzos de conservación.

IX. ANEXOS

Anexo 1. *Protocolo de extracción de ADN*

1. Se pesaron 0.25 g de cada muestra y se colocaron en tubos de 1.5 ml de centrifuga y se macero dentro del tubo con ayuda de una vara de metal.
2. Se adicionaron 180 µl de buffer ATL, junto a 20 µl de proteinasa K, se mezclaron en vortex durante cinco segundos y se dejó incubar en baño maría seco a 56°C por aproximadamente 20-24 horas o hasta que el tejido estuviera completamente lisado.
3. Después de la incubación, al tubo se le adicionaron 200 µl de buffer AL y 200 µl de etanol al 96%, se mezclaron en vortex 10 segundos. De esta mezcla se obtuvo 500-800 µl, que se depositó en el tubo “DNeasy Mini Spin”
4. La columna (DNeasy Mini Spin) se centrifugo a 8000 revoluciones por minuto (RPM) durante un minuto. El contenido del tubo colector se desechó con cloro al 10%
5. La columna se transfirió a un tubo colector nuevo de 2 ml, se adicionaron 500 µl de buffer AW1, se centrifugo a 8000 RPM durante un minuto. Nuevamente el contenido del tubo colector se descartó con cloro 10%.
6. La columna se transfirió nuevamente a un tubo colector nuevo, se adicionaron 500 µl de buffer AW2, se centrifugo a 14000 RPM durante tres minutos. Se descartó el contenido del tubo de la misma forma que los pasos anteriores.
7. Se transfirió la columna a un tubo de centrifuga de 1.5 ml. A la columna se le adiciono 200 µl de buffer AE y se dejó incubar durante cinco minutos a temperatura ambiente, una vez transcurrido el tiempo se centrifugo a 8000 RPM durante un minuto.
8. La calidad y la cantidad del ADN obtenido se determinó mediante un espectrofotómetro (Nanodrop 2000c; Thermo Scientific®).
9. El ADN de las muestras se almaceno a -20°C para su posterior análisis.

Anexo 2. Reactivos utilizados para cada enzima en los experimentos para las mezclas de PCR

Cuadro 9.1.- Reactivos para la mezcla de PCR utilizando como enzima Phusion Hot Start II DNA Polymerase Thermo Scientific®.

Reactivos para la PCR mix: 25 µl	Volumen (µl)
Taq polimerasa	0.2
Buffer 10x	2.5
MgCl	1
dNTP's (10 µM cada uno)	0.5
Oligo entero Antisentido (10 µM)	1
Oligo entero sentido (10 µM)	1
H2O Estéril uso molecular	17.8
DNA	1

Cuadro 9.2.- Reactivos para la mezcla de PCR utilizando como enzima GoTaq Flexi DNA Polymerase de PROMEGA®.

Reactivos para la PCR mix: 25 µl	Volumen (µl)
GoTaqPoly	0.15
5x green Buffer	5
MgCl	2.5
dNTP's (10 µM cada uno)	0.5
Oligo entero Antisentido (10 µM)	1
Oligo entero sentido (10 µM)	1
H2O Estéril uso molecular	13.85
DNA	1

Cuadro 9.3.- Reactivos para la mezcla de PCR utilizando como enzima Master Mix Green Taq PROMEGA®.

Reactivos para la PCR mix: 25 µl	Volumen (µl)
Master Mix green	12.5
DMSO	0.5
Oligo entero Antisentido (10 µM)	2
Oligo entero sentido (10 µM)	2
H2O Estéril uso molecular	7
DNA	1

Anexo 3. Muestras procesadas en el estudio

Cuadro 9.4.- Muestras obtenidas por localidad y especie.

Localidad	Especie	Tejido	Hisopados
Cuatro Palos	<i>Ecnomiohyla miotympanum</i>	1	1
El Chuveje	<i>Ecnomiohyla miotympanum</i>	-	1
La Escondida	<i>Ecnomiohyla miotympanum</i>	1	-
Las Adjuntas	<i>Incilius nebulifer</i>	1	-
Neblinas	<i>Ecnomiohyla miotympanum</i>	2	-
Presa Jalpan	<i>Incilius nebulifer</i>	-	1
	<i>Rhinella horribilis</i>	-	2
Punte de Dios	<i>Ecnomiohyla miotympanum</i>	7	3
	<i>Lithobates berlandieri</i>	1	-
San Juan de los Duran	<i>Lithobates berlandieri</i>	2	-

Cuadro 9.6.- Distancias genéticas intraespecíficas de las muestras de *E. miotypanum* junto a las secuencias del GenBank y el grupo externo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
AM-7	-																		
AM-14	0.95	-																	
AM-15	1.15	0.19	-																
AM-16	0.77	0.57	0.77	-															
AM-21	0.95	0.01	0.19	0.57	-														
AM-24	0.96	0.01	0.19	0.57	0.01	-													
AM-26	0.96	0.01	0.19	0.57	0.01	0.01	-												
AM-30	0.96	0.01	0.19	0.57	0.01	0.01	0.01	-											
AM-31	0.76	0.19	0.38	0.77	0.19	0.19	0.19	0.19	-										
AM-32	0.96	0.01	0.19	0.57	0.01	0.01	0.01	0.01	0.19	-									
AM-34	0.96	0.01	0.19	0.57	0.01	0.01	0.01	0.01	0.19	0.01	-								
AM-36	0.96	0.01	0.19	0.57	0.01	0.01	0.01	0.01	0.19	0.01	0.01	-							
AM-38	0.96	0.01	0.19	0.57	0.01	0.01	0.01	0.01	0.19	0.01	0.01	0.01	-						
AM-39	0.96	0.01	0.19	0.57	0.01	0.01	0.01	0.01	0.19	0.01	0.01	0.01	0.01	-					
AP-1	0.95	0.01	0.19	0.57	0.01	0.01	0.01	0.01	0.19	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	-				
HO-11	0.96	0.01	0.19	0.57	0.01	0.01	0.01	0.01	0.19	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	-			
<i>E. miotypanum</i> AY843645	0.76	0.57	0.76	1.15	0.57	0.57	0.57	0.57	0.38	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	-		
<i>R. miotypanum</i> MH004107	1.5	1.56	1.12	1.56	1.23	1.25	1.58	1.46	2.6	2.5	1.6	1.4	1.32	1.25	2.1	2.1	2.6	-	
<i>E. miliara</i> FJ784360	16.4	16.9	17.1	16.8	16.9	16.9	16.9	16.9	16.7	16.9	16.9	16.9	16.9	16.9	16.9	16.9	16.2	15.4	-

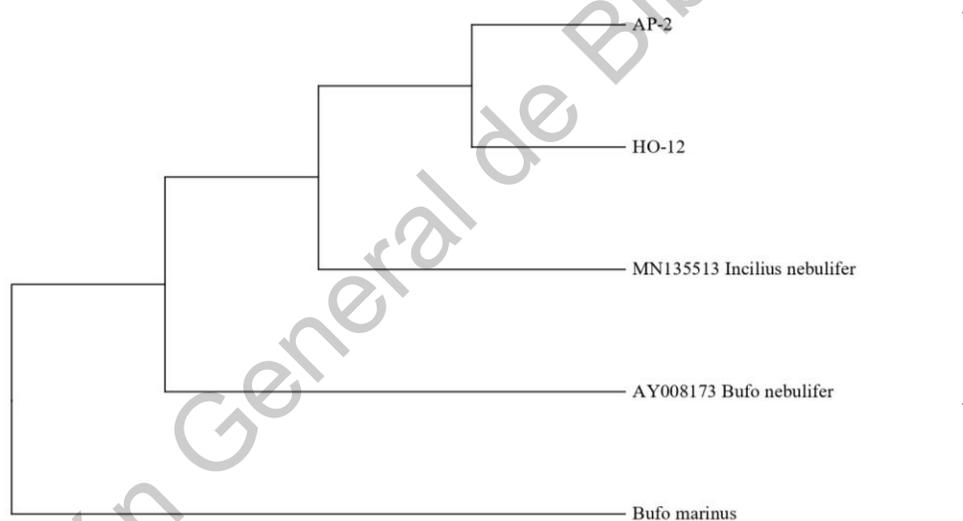


Figura 9.2.- Árbol Neighbor Joining para las distancias genéticas intraespecíficas de *Incilius nebulifer*.

Cuadro 9.7.- Distancias genéticas intraespecíficas de las muestras de *I. nebulifer* junto a las secuencias del GenBank y el grupo externo.

	1	2	3	4	5
AP-2	-				
HO-12	0.01	-			
<i>Incilius nebulifer</i> MN135513	0.01	0.18	-		
<i>Bufo nebulifer</i> HQ290945	0.01	0.18	0.001	-	
<i>Bufo marinus</i> DQ415553	9.69	9.91	9.69	9.69	-

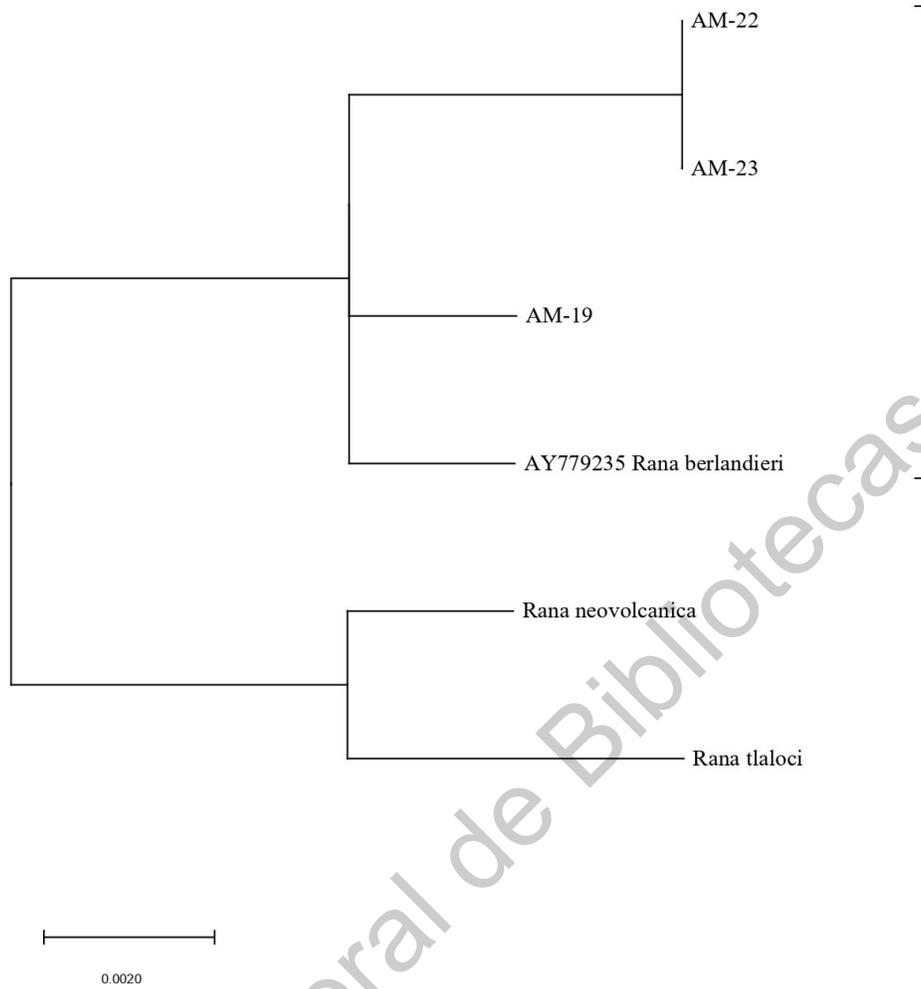
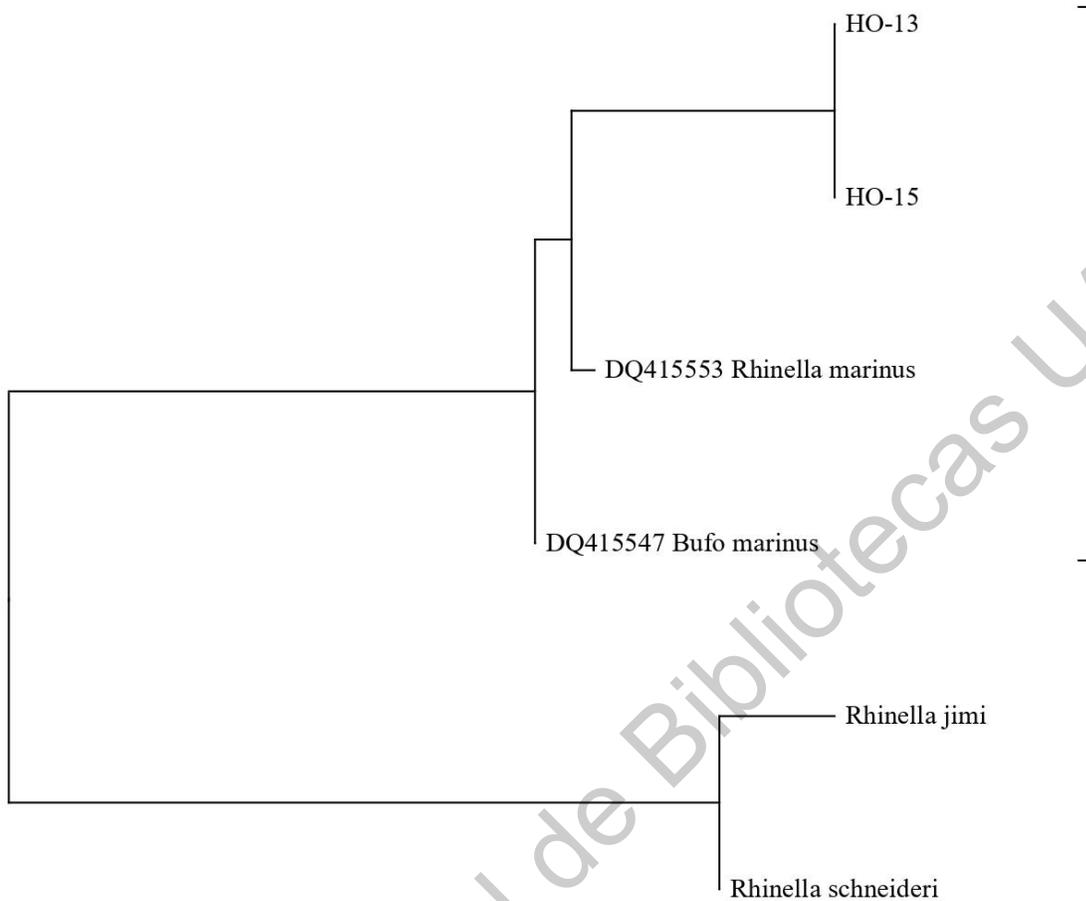


Figura 9.3.- Árbol Neighbor Joining para las distancias genéticas intraespecíficas de *Lithobates berlandieri*.

Cuadro 9.8.- Distancias genéticas intraespecíficas de las muestras de *L. berlandieri* junto a las secuencias del GenBank y el grupo externo.

	1	2	3	4	5	6
AM-19	-					
AM-22	0.58	-				
AM-23	0.58	0.01	-			
<i>Rana berlandieri</i> AY779235	0.39	0.58	0.58	-		
<i>Rana neovolcanica</i> AY779236	3.18	3.38	3.38	3.85	-	
<i>Rana tlaloci</i> AY779234	3.38	3.58	3.58	3.81	2.5	-



0.0050

Figura 9.4.- Árbol Neighbor Joining para las distancias genéticas intraespecíficas de *Rhinella horribilis*.

Cuadro 9.9.- Distancias genéticas intraespecíficas de las muestras de *R. horribilis* junto a las secuencias del GenBank y el grupo externo.

	1	2	3	4	5	6
HO-13	-					
HO-15	0.01	-				
<i>Bufo marinus</i> DQ415547.1	0.99	0.99	-			
<i>Bufo marinus</i> DQ415553.1	0.99	0.99	0.01	-		
<i>Bufo jimi</i> GU178795.1	5.77	5.77	4.69	4.9	-	
<i>Rhinella schneideri</i> JQ627201.1	5.35	5.35	4.28	4.48	0.4	-

Anexo 5. Datos de GBIF y muestreos

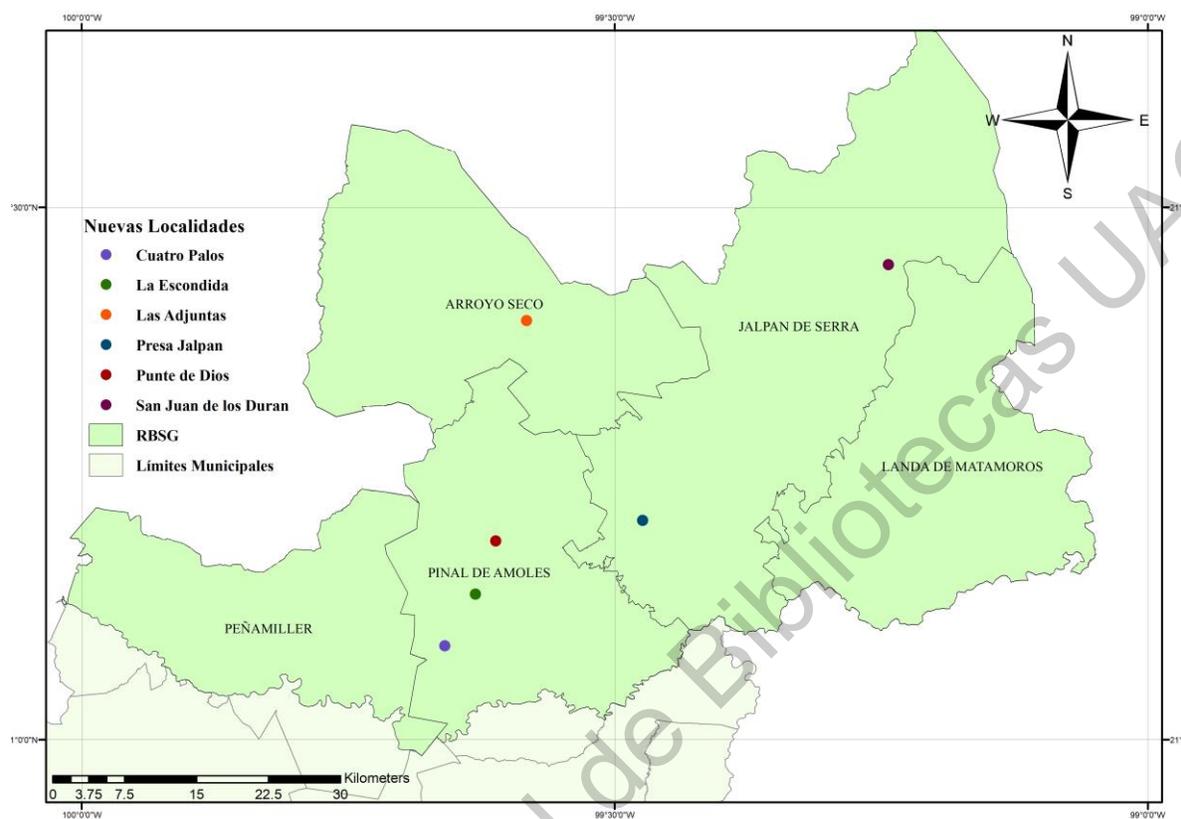


Figura 9.5.- Ampliación de la distribución en localidades de la RBSG para las especies de anuros identificadas en este estudio.

Anexo 6. *Especies de anuros de la RBSG*

Ecnomiohyla miotympanum es una especie endémica del país (Figura 26), que se distribuye en la vertiente del Atlántico, a lo largo de la Sierra Madre Occidental, en los estados de Nuevo León, Tamaulipas, Hidalgo; Querétaro, San Luis Potosí, Puebla y Veracruz, además de contar con poblaciones aisladas en Los Tuxtlas, Oaxaca y Chiapas (Duellman, 2001). Está catalogada por la IUCN como casi amenazada (NT), porque su grado de ocurrencia probable no es mayor de 20,000 km² y su hábitat está en declive, si la tendencia continúa esta especie podría ser reclasificarse como vulnerable (Santos-Barrera et al., 2004). Esta especie está asociada mayormente a bosques mesófilos de montaña y a vegetación riparia con cuerpos de agua lóticos y lenticos, comúnmente encontrados en el día en bromelias y demás epifitas, durante la noche bajan a la vegetación baja y rocas a lo largo de los arroyos (Duellman, 2001; Luría-Manzano, 2012).



Figura 9.6.- Amplexo de *E. miotympanum*.

Incilius nebulifer es una especie que se distribuye en la vertiente del golfo (Figura 27), desde el norte de Texas hasta el centro de Veracruz. Está catalogada por la IUCN como preocupación menor (LC), esto se debe a su amplia distribución, una gran tolerancia a un gran número de hábitats, una población presumiblemente grande y se estima que sus poblaciones no tendrán reducciones rápidas ni abruptas como para poder catalogarla como una especie en peligro (Hammerson & Canseco-Márquez, 2004). Su hábitat es muy extenso ya que parecen adaptarse y tolerar las alteraciones del hábitat realizadas por humanos, han

observado desde hábitats secundarios (áreas urbanas y suburbanas), así como en hábitats primarios (mesofilos de montaña).



Figura 9.7.- Adulto de *L. nebulifer*.

Lithobates berlandieri es una especie ampliamente distribuida en las costas del golfo de México y del caribe, esta especie se distribuye desde Nuevo México, Texas en la parte norte, hasta al norte de Nicaragua en la parte sur, abarcando Estados Unidos, México, Guatemala, Belice y Nicaragua. Está catalogada por la UICN como preocupación menor (LC), gracias a su amplia distribución, su gran tolerancia a diversos hábitats y una gran población (AmphibianWeb, 2020; Santos-Barrera et al., 2010). A pesar de que la IUCN considera que esta especie no requiere algún tipo de protección, la NOM-059-SEMARNAT-2010 del gobierno mexicano, considera que este taxón si requiere protección por lo cual está catalogada en protección especial (Pr), debido a una pérdida del hábitat, gracias al cambio de uso de suelo, lo que incide negativamente a su viabilidad (Ramírez-Bautista & Arizmendi, 2004; SEMARNAT, 2010). Estas ranas son semiacuaticas por lo que su hábitat idóneo son cuerpos de agua con vegetación cercana, regularmente encontradas escondidas entre la vegetación riparia circundante, a su vez es una especie que tiene alta tolerancia a la perturbación (Figura 28) (AmphibianWeb, 2020; Ramírez-Bautista & Arizmendi, 2004),



Figura 9.8.- Abrevadero natural donde se encontró el organismo larval de *L.*

Rhinella horribilis es una especie ampliamente distribuida, naturalmente se encuentra desde el sur de Texas (Estados Unidos) pasando por México tropical y América central, hasta el norte de América del sur (Brasil, Perú, Bolivia, Venezuela, Colombia y Las Guayanas), pero ha sido introducida en varios países como Australia, Filipinas; el este de los Estados Unidos y Hawái, Japón, China y en varias islas del Caribe, esta especie se ha distinguido por ser altamente invasiva, desplazando especies nativas. Está catalogada por la IUCN como preocupación menor (NT), puesto que tiene una amplia distribución, poblaciones grandes y altamente tolerante a diferentes hábitats (AmphibianWeb, 2020; Solís et al., 2009). Esta especie se desarrolla mejor en zonas con poca vegetación o donde la vegetación es abierta, por lo que las zonas perturbadas (campos de agricultura, ganadería y cambio de uso de suelo) son beneficiosas para esta especie (Solís et al., 2009).

X. Literatura citada

- Acevedo, A. A., Lampo, M., & Cipriani, R. (2016). The cane or marine toad, *Rhinella marina* (Anura, Bufonidae): Two genetically and morphologically distinct species. *Zootaxa*, 4103(6), 574–586. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4103.6.7>
- AmphibianWeb. (2020). Acerca de los anfibios. Retrieved January 31, 2020, from <https://amphibiaweb.org>
- Angulo, A. (2002). Anfibios y paradojas: perspectivas sobre la diversidad y las poblaciones de anfibios. *Ecología Aplicada*, 1(1), 87–91.
- Balcells, E. (2001). *Instrucciones sobre observación y eventual captura para muestreos de anfibios o batracios en el Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido*.
- Becker, C. G., Fonseca, C. R., Haddad, C. F. B., Batista, R. F., & Prado, P. I. (2007). Habitat Split and the Global Decline of Amphibians. *Science*, 318(December), 1775–1778.
- Bradley, H. S., & Macknight, M. L. (1996). The Polytypic species revisited :Genetic Differentiation and Molecular Phylogenetics of the Tiger Salamander *Ambystoma trigrinum* (Amphibia: Caudata) Complex. *Evolution*, 50(1), 417–433.
- Broquet, T., Berset-Braendli, L., Emaresi, G., & Fumagalli, L. (2007). Buccal swabs allow efficient and reliable microsatellite genotyping in amphibians. *Conserv Genet*, 8, 509–511. <https://doi.org/10.1007/s10592-006-9180-3>
- Caminer, M. A., & Ron, S. R. (2014). Systematics of treefrogs of the *Hypsiboas calcaratus* and *Hypsiboas fasciatus* species complex (Anura , Hylidae) with the description of four new species. *ZooKeys*, 370, 1–68. <https://doi.org/10.3897/zookeys.370.6291>
- Cannatella, D. C. (1993). Amphibian relationships: phylogenetic analysis of morphology and molecules, 1–7.
- Carabias-Lillo, J., Provencio, E., Maza-Elvira, J. de la, & Ruiz-Corzo, M. I. (1999). *Programa de Manejo Reserva de la Biosfera Sierra Gorda* (1a edición). México: Instituto Nacional de Ecología.

- Cedeño-Vázquez, R., Mandujano, R. C., & Tijera, C. P. de la. (2000). *Guía rústica de los anfibios de la región de calakmul, campeche, méxico*. Calakmul.
- Chavez, E. A., Valdez-Ornelas, V. A., & Salgado-Barragán, J. (1995). La explotación y disponibilidad de rana en el noroeste. *Ciencia Ergo Sum*, 2(3), 361–366.
- CONANP. (2000). Plan de Manejo Reserva de Bisfera Sierra Gorda. In *Programa de Manejo Reserva de la Biosfera Sierra Gorda* (p. 48).
- Cruz-Elizalde, R., Ramírez-Bautista, A., Hernández-Salinas, U., Berriozabal-Islas, C., & Wilson, L. D. (2019). An updated checklist of the herpetofauna of Querétaro, Mexico: species richness, diversity, and conservation status. *Zootaxa*, 2(July), 273–290.
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.4638.2.7>
- Cryer, J., Wynne, F., Price, S. J., & Puschendorf, R. (2019). Cryptic diversity in *Lithobates warszewitschii* (Amphibia, Anura, Ranidae). *ZooKeys*, 838, 49–69.
<https://doi.org/10.3897/zookeys.838.29635>
- Dixon, J. R., Ketchersid, C. A., & Lieb, C. S. (1972). The herpetofauna of Queretaro, Mexico, with remarks on taxonomic problems. *The Southwestern Naturalist*, 16(3), 225–237.
- Dixon, J. R., & Lemos-Espinal, J. A. (2010). *Anfibios y reptiles del estado de Querétaro, México*. (J. R. Dixon & J. A. Lemos Espinal, Eds.) (Primera). Querétaro.
- Duellman, W. E. (2001). *The hylid frogs of Middle America* (Segunda ed). Ithaca, New York: Natural History Museum, University of Kansas.
- E. V. Pelt-Verkuil, A. V. Belkum, J. P. H. (2008). *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*.
- ESRI. (2020). ArcMaps Ver. 10.5. Environmental System Research Institute, Redlands.
- Eto, K., Matsui, M., & Nishikawa, K. (2016). A new highland species of dwarf litter frog genus *Leptobrachella* (Amphibia : Anura : Megophryidae) from Sarawak. *Raffles Bulletin of Zoology*, 64, 194–203.
- Faivovich, J., Haddad, C. F. B., Garcia, P. C. A., Frost, D. R., Campbell, J. A., & Wheeler,

- W. C. (2005). Systematic review of the frog family hylidae , with special reference to hylinae : phylogenetic analysis and taxonomic revision. *American Museum of Natural History*, 294, 1–240.
- Faivovich, J., Pereyra, M. O., Luna, M. C., Hertz, A., Blotto, B. L., Vásquez-Almazán, C. R., ... Haddad, C. F. B. (2018). On the Monophyly and Relationships of Several Genera of Hylini (Anura : Hylidae : Hylinae), with Comments on Recent Taxonomic Changes in Hylids. *South American Journal of Herpetology*, 13(1), 1–32. <https://doi.org/10.2994/SAJH-D-17-00115.1>
- Feng, Y., Blackburn, D. C., Liang, D., Hillis, D. M., Wake, D. B., & Cannatella, D. C. (2017). Phylogenomics reveals rapid , simultaneous diversification of three major clades of Gondwanan frogs at the Cretaceous – Paleogene boundary. *PNAS*, 114(29), E5864–E5870. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704632114>
- Flores-Villela, O. A., Mendoza, F., & Gonzales-Porter, G. (1995). Recopilacion de claves para la determinacion de anfibios y reptiles de mexico. *Publ. Esp. Mus. Zool*, 10, 1–285.
- Fouquet, A., Gilles, A., Vences, M., Marty, C., Blanc, M., & Gemmell, N. J. (2007). Underestimation of Species Richness in Neotropical Frogs Revealed by mtDNA Analyses. *PloS One*, 2(10), e1109. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001109>
- García-Trejo, R. (2015). *Efecto de una cepa de levadura concentrada (saccharomyces cerevisiae) sobre las poblaciones de la familia enterobacteriaceae en corderos de raza blackbelly.*
- Girard, C. (1854). Alist of North American bufonids, with diagnosis of new species. *Proceedings Academy of Natural Sciences*, 7, 86–88.
- Goldberg, C. S., Kaplan, M. E., & Schwalbe, C. R. (2003). From the Frog’s Mouth: Buccal Swabs for Collection of DNA from Amphibians. *Herpetological Review*, 34.
- Grosjean, S., Ohler, A., Chuaynkern, Y., Cruaud, C., & Hassanin, A. (2015). Improving biodiversity assessment of anuran amphibians using DNA barcoding of tadpoles . Case studies from Southeast Asia. *C. R. Biologies*.

<https://doi.org/10.1016/j.crv.2015.03.015>

- Gunther, K., Trejo-Pérez, R., Reuber, V., Wehrenberg, G., & Méndez-de-la-Cruz, F. (2016). A survey of tadpoles and adult anurans in the Sierra Madre del Sur of Oaxaca, Mexico (Amphibia : Anura). *Mesoamerican Herpetology*, 3, 639–660.
- Gutiérrez, D. G. (2018). *Variación genética de insectos descortezadores (Dendroctonus mexicanus) provenientes de tres regiones de México.*
- Hammerson, G., & Canseco-Márquez, L. (2004). *Incilius nebulifer*. *The IUCN Red List of Threatened Species*, e.T54714A1.
- Hay, J. A., Ruvinsky, I., Hedges, S. B., & Maxson, L. R. (1995). Phylogenetic Relationships of Amphibian Families Inferred from DNA Sequences of Mitochondrial 12s and 16s Ribosomal RNA Genes. *Molecular Biology Evolutionary*, 12(5), 928–937.
- Heyer, R., Donnelly, M. A., Foster, M., & McDiarmid, R. (2014). *Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Amphibians.*
- Hillis, D. M., Frost, J. S., & Wright, D. A. (1983). Phylogeny and Biogeography of the *Rana pipiens* Complex : A Biochemical Evaluation. *Society of Systematic Biologists Phylogeny*, 32(2), 132–143.
- Hocking, D. J., & Babbitt, K. J. (2014). Amphibian Contributions to Ecosystem Services. *Herpetological Conservation and Biology*, 9(1), 1–17.
- Hopkins, W. A. (2007). Amphibians as Models for Studying Environmental Change. *ILAR Journal*, 48(3), 270–277.
- IUCN. (2019). The IUCN Red List of Threatened Species. Retrieved from <http://www.iucnredlist.org>
- Kenneth Dodd. (2009). *Amphibian Ecology and Conservation: A Handbook of Techniques* (OUP Oxford).
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X : Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

- López-González, C. A., Camargo-Aguilar, G. M., Saucedo, K. U., & Lara-Díaz, N. (2019). A Wandering Black Bear (*Ursus americanus* , Pallas 1780) in the Sierra Gorda Biosphere Reserve , Queretaro, *182*(2), 252–259.
- Luría-Manzano, R. (2012). *Ecología trófica del ensamblaje de anuros riparios de San Sebastian Tlacotepec, Sierra Negra de Puebla*. Universidad Autónoma del Estado Hidalgo.
- Madden, T. L., Tatusov, R. L., & Zhang, J. (1996). Applications of network BLAST server. *PubMed*, *266*, 131–141.
- Mccranie, J. R., & Rovito, S. M. (2014). New species of salamander (Caudata: Plethodontidae: Cryptotriton) from Quebrada Cataguana, Francisco Morazán, Honduras, with comments on the taxonomic status of *Cryptotriton wakei*, (May). <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3795.1.6>
- Medeiros, N., Garcia, R., Rinaldi, G., & Ferroni, E. (2010). Molecular Phylogenetics and Evolution Late Miocene diversification and phylogenetic relationships of the huge toads in the *Rhinella marina* (Linnaeus , 1758) species group (Anura : Bufonidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *57*(2), 787–797. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.08.025>
- Mendelson, J. R., Kinsey, C. T., & Murphy, J. B. (2015). A review of the biology and literature of the Gulf Coast Toad (*Incilius nebulifer*), native to Mexico and the United States. *Zootaxa*, *3974*(4), 517–537.
- Mendelson, J. R., Mulcahy, D. G., Williams, T. S., & Sites, J. W. (2011). A phylogeny and evolutionary natural history of mesoamerican toads (Anura: Bufonidae: *Incilius*) based on morphology, life history, and molecular data. *Zootaxa*, *3138*, 1–34.
- Mendoza-Almeralla, C., Burrowes, P., & Parra-Olea, G. (2015). La quitridiomycosis en los anfibios de México: Una revisión. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, *86*(1), 238–248. <https://doi.org/10.7550/rmb.42588>
- Mitani, T., Akane, A., Tokiyasu, T., Yoshimura, S., & Okii, Y. (2009). Identification of animal species using the partial sequences in the mitochondrial 16S rRNA gene. *Legal*

Medicine, 11, S449–S450. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2009.02.002>

Montes-de-Oca, A. N. (1999). *Anfibios y reptiles del estado de Querétaro*.

Mulcahy, D. G., & Mendelson, J. R. (2000). Phylogeography and Speciation of the Morphologically Variable , mtDNA Phylogeography and Speciation of the Morphologically Variable , Widespread Species *Bufo valliceps* , Based on Molecular Evidence from mtDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 17(2), 173–189. <https://doi.org/10.1006/mpev.2000.0827>

Mulcahy, D. G., Morrill, B. H., & Mendelson, J. R. (2006). Historical biogeography of lowland species of toads (*Bufo*) across the Trans- Mexican Neovolcanic Belt and the Isthmus of Tehuantepec. *Journal of Biogeography*, 33, 1889–1904. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2006.01546.x>

Müller, A. S., Lenhardt, P. P., & Theissinger, K. (2013). Pros and cons of external swabbing of amphibians for genetic analyses. *Eur J Wildl Res*, 59, 609–612. <https://doi.org/10.1007/s10344-013-0747-2>

Mullis, K., & Faloona, F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chainreaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335–350.

Palumbi, S., Gunn, L., Collins, P. J., O'connell, M. J., & O'shea, H. (2002). The simple fool's guide to PCR. *Irish Veterinary Journal*, 68(1), 1–45. <https://doi.org/10.1186/s13620-015-0060-3>

Parmelee, J. R., Knutson, M. G., & Lyon, J. E. (2002). *A Field Guide to Amphibian Larvae and Eggs of Minnesota , Wisconsin , and Iowa*. Washington, D.C: U.S. Geological Survey, Biological Resources Division, Information and Technology Report USGS/BRD/ITR-2002-0004.

Parra-Olea, G. (2004). Phylogenetic relationships of the genus *Chiropterotriton* (Caudata : Plethodontidae) based on 16S ribosomal mtDNA, 81, 2048–2060. <https://doi.org/10.1139/Z03-155>

Parra-Olea, G., Flores-Villela, O., & Mendoza-Almeralla, C. (2014). Biodiversidad de anfibios en Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(SUPPL.), 460–466.

<https://doi.org/10.7550/rmb.32027>

Parra-Olea, G., García-París, M., & Wake, D. B. (2002). Phylogenetic Relationships among the Salamanders of the *Bolitoglossa macrinii* Species Group (Amphibia : Plethodontidae), with Descriptions of Two New Species from Oaxaca (México). *Journal of Herpetology*, 36(3), 356–366.

Paternina, L. E., Verbel-Vergara, D., & Bejarano, E. E. (2016). Comparación y utilidad de las regiones mitocondriales de los genes 16S y COX1 para los análisis genéticos en garrapatas (Acari : Ixodidae). *Biomédica*, 36, 295–302.

Paz, A., Gonzalez, M., & Crawford, A. J. (2011). Códigos de barras de la vida: introducción y perspectiva DNA. *Acta Biológica Colombiana*, 16(3), 161–176.

Pérez-almazán, C., Manríquez-Morán, N. L., Balderas-Plata, M. A., Némiga, X. A., & López-Alcaide, S. (2017). Implicaciones de la precipitación sobre la evolución del tamaño corporal y distancia interaxilar en el complejo *Aspidoscelis gularis* (Squamata : Teiidae). *Biogía Tropical*, 65(2), 725–733.

Pidancier, N., Miquel, C., & Miaud, C. (2003). Buccal swabs as a non-destructive tissue sampling method for DNA analysis in amphibians. *HERPETOLOGICAL JOURNAL*, 13, 175–178.

Ramírez-Bautista, A., & Arizmendi, M. C. (2004). *Rana berlandieri*: Sistemática e historia natural de algunos anfibios y reptiles de México. *Bases de Datos SNIB-CONABIO*, 1–7.

Real, R., Barbosa, A. M., Martínez-Solano, Í., & García-París, M. (2005). Distinguishing the distributions of two cryptic frogs (Anura : Discoglossidae) using molecular data and environmental modeling. *Canadian Journal of Zoology*, 83, 536–545.

<https://doi.org/10.1139/Z05-040>

Rovito, S. M., Parra-Olea, G., Hanken, J., Bonett, R. M., & Wake, D. B. (2013). Adaptive radiation in miniature : the minute salamanders of the Mexican highlands (Amphibia : Plethodontidae : Thorius). *Biological Journal of the Linnean Society*, 109, 622–643.

Rovito, S. M., Parra-Olea, G., Lee, D., & Wake, D. B. (2012). A new species of

Bolitoglossa (Amphibia , Caudata) from the Sierra de Juárez , Oaxaca , Mexico.
ZooKeys, 185, 55–71. <https://doi.org/10.3897/zookeys.185.1146>

Saiki, R., Gelfand, H., Stoffel, S., Scharf, J., Higuchi, R., Horn, T., ... Erlich, H. (1988).
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA
polymerase. *Science*, (239), 487–491.

Salducci, M., Marty, C., Chappaz, R., & Gilles, A. (2002). Molecular phylogeny of French
Guiana Hyliinae : implications for the systematic and biodiversity of the Neotropical
frogs. *Biologies*, 325, 141–153.

Sandoval-Comte, A., Pineda, E., Rovito, S. M., & Luría-Manzano, R. (2017). A new
species of Isthmura (Caudata: Plethodontidae) from the montane cloud forest of
central Veracruz, Mexico. *Zootaxa*, 4277(4), 573–582.
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.4277.4.7>

Santos-Barrera, G., Canseco-Márquez, L., & Flores-Villela, O. (2004). Ecnomiohyla
miotympanum. *The IUCN Red List of Threatened Species*, e.T55566A1.

Santos-Barrera, G., Hammerson, G., Köhler, G., Wilson, L. D., Lee, J., & Vázquez, R. C.
(2010). Lithobates berlandieri , Rio Grande Leopard Frog. *The IUCN Red List of
Threatened Species*, e.T58561A1.

Santos, S. P., Ibáñez, R., & Ron, S. R. (2015). Systematics of the Rhinella margaritifera
complex (Anura , Bufonidae) from western Ecuador and Panama with insights in the
biogeography of Rhinella alata. *ZooKeys*, 501, 109–145.
<https://doi.org/10.3897/zookeys.501.8604>

Sanz, M. M. (2005). De la taxonomía tradicional a las filogenias moleculares. *Bol. R. Soc.
Esp. Hist. Nat.*, 100, 45–65.

SEMARNAT. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección
ambiental– Especies nativas de México de flora y fauna silvestres– Categorías de
riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio– Lista de especies en
riesgo. *Diario Oficial de La Federación 30 Diciembre, 2010. Actualizacion 14
Noviembre, 2019*, 78.

- Sequeira, F., Sodré, D., Ferrand, N., Bernardi, J. A. R., Sampaio, I., Schneider, H., & Vallinoto, M. (2011). Hybridization and massive mtDNA unidirectional introgression between the closely related Neotropical toads *Rhinella marina* and *R. schneideri* inferred from mtDNA and nuclear markers. *Evolutionary Biology*, *11*(264), 1–15.
- Serrato-Díaz, A., Flores-Rentería, L., Aportela, J., & Sierra, E. (2014). PCR : reacción en cadena. In *Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: Aspectos Te ricos y Pr cticos* (pp. 53–74).
- Solís, F., Ib a ez, R., Hammerson, G., Hedges, B., Diesmos, A., Matsui, M., ... Ponce, P. (2009). *Rhinella marina*. *The IUCN Red List of Threatened Species*, e.T41065A1.
- Stebbins, R. C., & Cohen, N. W. (1997). *A Natural History of Amphibians*. California: Princeton University Press.
- Storfer, A., Eastman, J. M., & Spear, S. F. (2009). Modern Molecular Methods for Amphibian Conservation. *BioScience*, *59*(7), 559–571.
<https://doi.org/10.1525/bio.2009.59.7.7>
- Streicher, J. W., Crawford, A. J., & Edwards, C. W. (2009). Molecular Phylogenetics and Evolution Multilocus molecular phylogenetic analysis of the montane Craugastor podiciferus species complex (Anura : Craugastoridae) in Isthmian Central America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *53*(3), 620–630.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.07.011>
- Sunyer, J., Wake, D. B., Townsend, J. H., Travers, S. L., Rovito, S. M., Papenfuss, T. J., ... K hler, G. (2010). A new species of worm salamander (Caudata : Plethodontidae : Oedipina) in the subgenus Oeditriton from the highlands of northern Nicaragua. *Zootaxa*, *2613*, 29–39.
- Tessaro, S. G., & López-González, C. A. (2011). *Manual de Técnicas para el estudio de la Fauna*. Querétaro, México: Universidad Autónoma de Querétaro-Instituto de Ecología.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTALX windows interface : flexible strategies for multiple sequence alignment

aided by quality analysis tools, 25(24), 4876–4882.

Toledo, L. F., Ribeiro, R. S., & Haddad, C. F. B. (2007). Anurans as prey : an exploratory analysis and size relationships between predators and their prey. *Journal of Zoology*, 271, 170–177. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2006.00195.x>

Valencia-Aguilar, A., Cortés-Gómez, A. M., & Ruiz-, C. A. (2013). Ecosystem services provided by amphibians and reptiles in Neotropical ecosystems. *International Journal of Biodiversity Science, Ecosystem Services & Management*, 9(3), 257–272. <https://doi.org/10.1080/21513732.2013.821168>

VALLINOTO, M., SEQUEIRA, F., SODRE, D., BERNARDI, J. A. R., & SCHNEIDER, I. S. H. (2010). Phylogeny and biogeography of the *Rhinella marina* species complex (Amphibia, Bufonidae) revisited: implications for Neotropical diversification hypotheses. *Zoologica Scripta*, 39(2), 128–140. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2009.00415.x>

Vallinoto, M., Sequeira, F., Sodr , D., Bernardi, J. A., Sampaio, I., & Schneider, H. (2010). Systematic review of the frog family hylidae , with special reference to hylinae : phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Zoologica Scripta*, 39(2), 128–140. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2009.00415.x>

Vences, M., Nagy, Z. T., Sonet, G., & Verheyen, E. (2012). Chapter 5 DNA Barcoding Amphibians and Reptiles. *Methods in Molecular Biology*, 858(79–107). <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-591-6>

Vences, M., Thomas, M., Bonett, R. M., & Vieites, D. R. (2005). Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding : chances and challenges. *Philosophical Transactions of The Royal Society*, 360, 1859–1868. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1717>

Vences, M., Thomas, M., Meijden, A. Van Der, Chiari, Y., & Vieites, D. R. (2005). Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology*, 2(5), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-2-5>

Wake, D. B., & Koo, M. S. (2018). Amphibians. *Current Biology*, 28, 1221–1242. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.09.028>

- Wake, D. B., & Vredenburg, V. T. (2008). Are we in the midst of the sixth mass extinction ? A view from the world of amphibians. *PNAS*, *105*(May 2014), 11466–11473. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801921105>
- Wang, H., Tsai, M., Tu, M., & Lee, S. (2000). Universal Primers for Amplification of the Complete Mitochondrial. *Zoological Studies*, *39*(1), 61–66.
- Xiong, R., Li, C., & Jiang, J. (2016). Lineage divergence in *Odorrana graminea* complex (Anura: Ranidae: Odorrana). *Zootaxa*, *3963*(2), 201–229. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3963.2.3>
- Yarza, P., Richter, M., Euzeby, J., Amann, R., Schleifer, K., Ludwig, W., ... Rossello, R. (2008). The All-Species Living Tree project : A 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Systematic and Applied Microbiology*, *31*, 241–250. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.07.001>
- Zaldívar-Riverón, A., León-Regagnon, V., & Nieto-Montes-de-Oca, A. (2004). Phylogeny of the Mexican coastal leopard frogs of the *Rana berlandieri* group based on mtDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *30*, 38–49. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00141-6](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00141-6)