

Universidad del Valle de Guatemala
Facultad de Ciencias y Humanidades



Diferenciación filogenética y morfométrica en
poblaciones de *Agalychnis moreletii*
(Anura:Hylidae) a lo largo de su distribución.

Trabajo de investigación presentado por
Francisco Herrarte Samayoa

para optar al grado de Licenciado en Biología.

Guatemala
2022

Universidad del Valle de Guatemala
Facultad de Ciencias y Humanidades



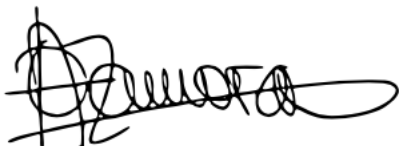
Diferenciación filogenética y morfométrica en
poblaciones de *Agalychnis moreletii*
(Anura:Hylidae) a lo largo de su distribución.

Trabajo de investigación presentado por
Francisco Herrarte Samayoa

para optar al grado de Licenciado en Biología.

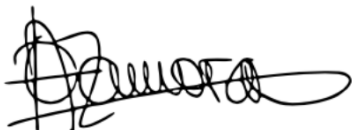
Guatemala
2022

Vo. Bo.



PhD. Alejandra Zamora

Tribunal examinador:



PhD. Alejandra Zamora



MSc. Jose Miguel Morales



Lic. Alejandro Vásquez

Fecha de aprobación del examen de graduación:

(Guatemala, 11 de noviembre de 2022)

AGRADECIMIENTOS

Terminar esta carrera hubiera sido imposible sin el apoyo incondicional de mi familia, en especial quisiera agradecer a mi padre Rafael y a mi madre Claudia no solo por respaldar materialmente mi sueño de estudiar biología sino por estar en cada paso de la carrera a mi lado dándome la motivación y comprensión que necesite en todos los altos y bajos durante estos 7 años. Me siento muy afortunado por la familia que tengo, mis 2 hermanas Pili y Anita siempre han estado cuando las necesito, 4 hermosos abuelos que me guiaron en diferentes partes de mi vida y ahora me siguen acompañando en espíritu los que no están a través de la única que me queda, la Pitia.

Durante este último paso de la carrera tuve la fortuna de tener a una brillante asesora, Almejandra Zamora, el apoyo y la confianza que me dio durante la elaboración de este trabajo fue algo por lo que siempre estaré agradecido. Doy gracias igualmente por el apoyo de mis otros dos asesores Chus y Mike por ayudarme a entregar una investigación de calidad y por darme herramientas cruciales durante sus roles como catedráticos.

Durante estos años tuve una gran cantidad de compañeros que me ofrecieron su amistad y convirtieron jornadas tediosas en días llenos de risas y afecto. Me agrada mencionar la lista de personas que cumplen lo anteriormente dicho es extensa y dudo poder mencionarlos a todos, sin embargo, quisiera agradecer a Guido, Wicho, Erik, Felipe, Daniel, Andrés, Melvin, Julián, Chiri, Ericka, Andre, Isa, Jairo y muchos más por su amistad. Un agradecimiento especial a Venado, Lic, Flor, Mafer, Bernie, Hellen, Samuel, Monge y Adriana por las aventuras en campo, por la ayuda durante la elaboración de este trabajo final y por la maravillosa amistad y cariño que me han dado durante este tiempo, siempre los tendré en mi corazón.

A la Universidad del Valle de Guatemala y al Departamento de Biología por brindarme los conocimientos que adquirí durante estos años y por facilitar el equipo que necesité para desarrollar este proyecto. A la Universidad de Arlington, Texas por proporcionar las muestras necesarias para desarrollar la siguiente investigación.

INDICE

Agradecimientos	VII
Lista de figuras	X
Lista de cuadros	XI
Resumen	XII
Abstract	XIII
I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
III. Justificación.....	5
IV. Objetivos.....	7
V. Marco teórico.....	8
A. Genética de la conservación.....	8
B. Genética y diferenciación de las poblaciones.....	10
C. Diferenciación morfológica de poblaciones	11
D. <i>Agalychnis moreletii</i>	12
VI. Metodología	14
A. Sitio de estudio y colecta de muestras	14
B. Procedimientos.....	17
1. Amplificación del código de barras.....	17
2. Toma de medidas morfológicas	19
3. Análisis de datos.....	20
a. Análisis datos filogenéticos	21
b. Análisis datos morfométricos	22
VII. Resultados	23
VIII. Discusión de resultados	35
IX. Conclusiones	42
X. Recomendaciones	43
XI. Bibliografía	44
XII. Anexos	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de las ubicaciones geográficas de las poblaciones de <i>A. moreletii</i> muestreadas en el presente estudio	15
Figura 2. Mapa de la región central de Centroamérica y áreas geográficas representativas de la zona	16
Figura 3. Medidas morfométricas utilizadas para el análisis de diferenciación en la rana <i>Agalychnis moreletii</i> , en diferentes localidades a lo largo de distribución	19
Figura 4. Árbol filogenético construido bajo el método de Neighbor Joining para las secuencias concatenadas de los genes 16S-CytB	24
Figura 5. Árbol filogenético construido bajo el método de Máxima Verosimilitud para las secuencias concatenadas de los genes 16S-CytB	25
Figura 6. Árbol filogenético construido bajo el método de Inferencia Bayesiana para las secuencias concatenadas de los genes 16S-CytB	26
Figura 7. Red de haplotipos elaborada a partir de las 150 secuencias para el marcador molecular Citocromo B (CytB) agrupadas según las unidades de significancia evolutiva (ESU) establecidas	28
Figura 8. Dendrograma formado a partir de la relación de las 15 medidas morfométricas y las muestras de diferentes localidades a lo largo de la distribución de <i>A. moreletii</i>	30
Figura 9. Gráfico de análisis de componentes principales (PCA) construido a partir de la relación de las 15 medidas morfométricas y las muestras de diferentes localidades a lo largo de la distribución de <i>A. moreletii</i>	31
Figura 10. Gráfico de violín para la medida Distancia entre nostrilos (IND) en los individuos de <i>A. moreletii</i> en las 6 poblaciones asignadas (Atlántico, Pacífico, Veracruz, Guerrero, Oaxaca y Chiapas)	32
Figura 11. Gráfico de violín para la medida Largo de humero (LHU) en los individuos de <i>A. moreletii</i> en las 6 poblaciones asignadas (Atlántico, Pacífico, Veracruz, Guerrero, Oaxaca y Chiapas)	33
Figura 12. Gráfico de violín para la medida Largo del antebrazo (FOL) en los individuos de <i>A. moreletii</i> en las 6 poblaciones asignadas (Atlántico, Pacífico, Veracruz, Guerrero, Oaxaca y Chiapas)	34

Figura 13. Red de haplotipos elaborada a partir de las 154 secuencias para el marcador molecular 16S agrupadas según las unidades de significancia evolutiva establecidas	49
Figura 14. Gráfico de violín para la medida Diámetro del disco del dedo 4 de las patas traseras (DF4) en los individuos de <i>A. moreletii</i> en las 6 poblaciones asignadas (Atlántico, Pacífico, Veracruz, Guerrero, Oaxaca y Chiapas)	50
Figura 15. Gráfico de violín para la medida Diámetro del Tímpano (TD) en los individuos de <i>A. moreletii</i> en las 6 poblaciones asignadas (Atlántico, Pacífico, Veracruz, Guerrero, Oaxaca y Chiapas)	51
Figura 16. Gráfico de violín para la medida Ancho de la cabeza (HW) en los individuos de <i>A. moreletii</i> en las 6 poblaciones asignadas (Atlántico, Pacífico, Veracruz, Guerrero, Oaxaca y Chiapas)	52
Figura 17. Gráfico de violín para la medida Largo del muslo (THL) en los individuos de <i>A. moreletii</i> en las 6 poblaciones asignadas (Atlántico, Pacífico, Veracruz, Guerrero, Oaxaca y Chiapas)	53
Figura 18. Gel de agarosa al 1%, producto de PCR utilizando los marcadores mitocondriales 16S y Citocromo B	54

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Marcadores utilizados para amplificación de ADN	16
Cuadro 2. Receta para la amplificación.....	17
Cuadro 3. Programa del termociclador.....	17
Cuadro 4. Matriz de valores de estadístico ϕ_{ST} de diversidad genética para las cinco unidades establecidas dentro de la especie <i>A. moreletii</i> obtenidas a partir del marcador mitocondrial Citocromo B (CytB)	
Cuadro 5. Matriz de valores de estadístico ϕ_{ST} de diversidad genética para las cinco unidades establecidas dentro de la especie <i>A. moreletii</i> obtenidas a partir del marcador mitocondrial 16S	
Cuadro 6. Resultado de valores p significativos (<0.05) del modelo generalizado linear al comparar las medidas de individuos de la rana <i>A. moreletii</i> con las agrupaciones designadas según los resultados filogenético	25

RESUMEN

El grupo de los anfibios es el grupo de vertebrados más amenazado en la actualidad con la mayoría de sus especies experimentando un descenso poblacional. Esta disminución es ocasionada por diferentes amenazas como lo es la pérdida de hábitat debido al avance de la frontera agrícola y urbana, el cambio climático, enfermedades emergentes, entre otros. *Agalychnis moreletii* es un anuro distribuido desde el estado de Guerrero, México, hasta las tierras altas de Honduras, se caracteriza por una coloración verde en todo su dorso, sus flancos y muslos de un anaranjado continuo. La también nombrada rana de Morelet está clasificada como de preocupación menor (LC), debido a su extensa distribución y su relativa abundancia en ciertas partes de su distribución. Sin embargo, cabe resaltar que la categorización de amenaza dada por la IUCN no siempre refleja el estado de las especies en regiones específicas de su distribución debido a que la categorización se realiza en base de su estado población en su extensión total, por lo que es importante determinar la relación entre las poblaciones de las especies con una distribución amplia para un mejor asesoramiento de su estado de conservación.

Este estudio buscaba determinar las diferencias poblacionales de *A. moreletii* mediante más de 150 secuencias de ADN obtenidas de individuos en 29 localidades a lo largo de su fragmentada distribución a través de un análisis filogenético, morfométrico y la relación entre los resultados y la biogeografía de la región. Los resultados de dichos análisis determinaron cuatro unidades de significancia evolutiva dentro de las poblaciones de *A. moreletii* y una unidad extra fue descrita en base al análisis biogeográfico. Dichas agrupaciones dividen a la especie en: unidad Pacífico (sur de Chiapas, costa pacífica de Guatemala y El Salvador), unidad Chiapas (poblaciones del centro del estado), agrupación Veracruz, unidad Guerrero y la unidad sugerida, Atlántico (norte de Chiapas, vertiente atlántica de Guatemala, Belice y tierras altas de Honduras). No se encontró ninguna relación entre las agrupaciones determinadas y las medidas tomadas de los individuos en el análisis morfométrico.

ABSTRACT

The amphibian group is one of the vertebrates most threatened clades with most of its species experiencing population declines. These decreases are caused by various types of threats including the advancement of the urban and agrobusiness frontier, climate change, emergent diseases, amongst others. *Agalychnis moreletii* is an anuran distributed from the state of Guerrero, Mexico to the high lands of Honduras, this species is described as a green frog with flanks and thighs of a monotonous orange. The black-eyed tree frog is classified as Least Concerned (LC), thanks to its broad distribution and relative abundance in some of its range. Nevertheless, this categorization from the IUCN does not show the conservation needs of specific populations of the species because the evaluation is based on the entire range of distribution. Therefore, it's important to resolve the genetic relationships between the populations so the conservation status can be better assessed.

This study aimed to delimit genetic and morphological differences between the populations of *A. moreletii* with more than 150 DNA sequences of individuals from 29 locations throughout their whole distribution range. To do that I performed phylogenetic, morphometric, and biogeographic analysis. The results showed a population differentiation of four distinct evolutionary significant units (ESU) and an extra unit was proposed based on the biogeographic analysis. Therefore, the species is potentially divided in: Pacific unit (south of Chiapas, pacific coast of Guatemala and El Salvador populations), Chiapas unit (populations form the center of the state), Veracruz unit, Guerrero unit and the proposed unit been Atlantic (north of Chiapas, Atlantic slope of Guatemala, populations of Belize and populations form Honduras high lands). There was no evidence of differentiation between the divisions established for the species and the morphometric analysis.

I. INTRODUCCIÓN

El grupo de los anfibios es el grupo de vertebrados más amenazado en la actualidad con la mayoría de sus especies experimentando un descenso poblacional. Esta disminución es ocasionada por diferentes amenazas como lo es la pérdida de hábitat debido al avance de la frontera agrícola y urbana, el cambio climático y enfermedades emergentes, como es el caso de la quitridiomycosis, causada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*. Estas presiones causan la disminución de las poblaciones y a su vez han tenido un fuerte efecto en la distribución natural de las especies alterando los patrones ecológicos y la conectividad entre poblaciones (IUCN, 2017). Es debido a estas amenazas hacia los anfibios que ha surgido un interés mundial por investigar y promover la conservación de la biodiversidad restante antes de que la pérdida de biodiversidad sea irreversible (Adler, et al., 2008).

La región de Centroamérica Nuclear (NCA) es una de las zonas con las tasas más altas de biodiversidad en el mundo. Esta gran diversidad es producto de la coincidencia de muchas variables como lo es su clima tropical y ser el punto de unión de tres placas continentales (Cocos, Caribe y Norteamérica) produciendo por lo mismo fenómenos geológicos en toda la región (Savage, 1982). En lo que respecta a los anfibios, estos presentan una gran riqueza en la región al compararla con otras. Dentro de los anuros nativos de la región, se encuentra la familia Phyllomedusidae la cual presenta dos géneros dentro de la región y más de diez especies (Schmid, et al., 2018). *Agalychnis* (Cope, 1862) es uno de los géneros más diversos dentro de la familia, la cual cuenta con 15 especies, de las cuales 6 se distribuyen en la región (AmphibiaWeb, 2022).

Agalychnis moreletii es una especie distribuida desde el estado de Guerrero, México, hasta las tierras altas de Honduras. Esta rana suele habitar en la cercanía de pequeños cuerpos de agua loticos en bosques montanos húmedos entre 200 – 2130 msnm (Kohler, 2013). La rana de Morelet es clasificada como de preocupación menor (LC), debido a su extensa distribución y su relativa abundancia en ciertas partes de su distribución. Sin embargo, actualmente su estado poblacional se clasifica como en disminución debido a la continua

perdida de sus hábitats causado por el crecimiento de la frontera agrícola, la presencia de especies invasoras y por contaminación de cuerpos de agua por productos relacionado a agricultura (IUCN, 2017). Cabe resaltar que la categorización de amenaza dada por la IUCN no siempre refleja el estado de las especies en regiones específicas de su distribución ya que la categorización se realiza en base de su estado población a lo largo de su distribución, por lo que es importante determinar la relación entre las poblaciones de las especies con una distribución amplia. Este estudio busca determinar las diferencias poblaciones de *A. moreletii* a lo largo de su fragmentada distribución a través de un análisis filogenético, morfométrico y la relación entre los resultados y la biogeografía de la región.

A partir de las muestras genéticas se generaron un total de 132 secuencias concatenadas de los genes 16S ARN y Citocromo B. En base a estas secuencias se construyeron árboles filogenéticos bajo tres métodos diferentes siendo estos Neighbor Joining (NJ), Máxima Verosimilitud (ML) e inferencia bayesiana. Conforme las relaciones mostradas por la reconstrucción filogenética se establecieron cinco unidades de significancia evolutiva. El análisis de las medidas morfológicas fue utilizado para determinar si las diferencias morfológicas entre las poblaciones se relacionan con las agrupaciones propuestas. Esta comparación se realizó sometiendo las medidas y las agrupaciones de las poblaciones a un modelo de regresión logística múltiple, un análisis de componentes principales (PCA) y un dendrograma utilizando el método de agrupamiento UPGMA y el método de distancias Euclideo. Finalmente, se describió la diferenciación de las agrupaciones determinadas mediante el análisis de las barreras biogeográficas de la región.

II. ANTECEDENTES

La rana verde de Morelet o *Agalychnis moreletii* es un anuro de la familia Hylidae que se distribuye en la región nuclear de Centroamérica (Duméril, 1853). Originalmente colectada por Arthur Morelet en Cobán, Alta Verapaz, Guatemala, y descrita por primera vez por Duméril, 1853, como *Hyla moreletii*. *A. moreletii* como muchos otros anuros ha sido reasignado taxonómicamente por varios autores desde su primera descripción. Salvin, 1860, describió a otro holotipo encontrado en Cobán, Alta Verapaz, nombrado como *Hyla holochlora*, el cual posteriormente fue reasignado junto con *A. moreletii* por Boulenger, 1882. El género *Agalychnis* surge de la separación del género *Hyla*, restringiendo a las especies de este género a Norteamérica, norte de África, Europa y Asia. Las especies restantes provenientes de Centroamérica y Suramérica se dividieron en distintos géneros entre ellos el género *Agalychnis* descrito por Cope, 1865.

El género *Agalychnis* fue reasignado por última vez como parte del ya existente género *Phyllomedusa* por Kellogg, 1932. Dicha reasignación fue refutada y el género al cual la rana de Morelet pertenece regreso a ser nombrado como *Agalychnis* por Duellman, 1970. La especie es descrita como una rana verde de 66 mm en la distancia entre hocico-cloaca (SVL) en machos y 83 mm para hembras, membrana interdigital que ocupa $\frac{3}{4}$ del espacio entre dedos y se distingue de otras especies del mismo género por presentar una coloración anaranjada uniforme en muslos y flancos. *A. moreletii* se distribuye en bosque montanos húmedos entre 500 – 1500 msnm dentro de los estados de Veracruz, Oaxaca, Guerrero y Chiapas de México, en la mayoría del territorio de Guatemala exceptuando las tierras bajas de Petén, Belice, El Salvador y las tierras altas de Honduras (Duellman, 1970).

El uso de las técnicas filogenéticas como herramientas para establecer las relaciones taxonómicas han sido utilizadas exitosamente para diversos grupos, especialmente dentro de los metazoos (Grandcolas, et al., 2001). Dentro del grupo de anura, las técnicas filogenéticas han sido especialmente útiles para identificar a especies crípticas, las cuales se definen como especies diferentes con ninguna o pocas características morfológicas que las diferencien (Funk, et al., 2012). Dentro del género *Agalychnis*, el uso de las herramientas moleculares se ha aplicado para explicar las diferencias en la coloración de los flancos y muslos entre

poblaciones de la misma especie (Faivovich, et al., 2005). En un estudio enfocado en *Agalychnis callidryas* realizado en Costa Rica buscaba encontrar las razones del cambio de coloración de anaranjado a tonos purpuras en poblaciones dentro del territorio. Las técnicas moleculares fueron utilizadas para determinar la estructura genética de las poblaciones y determinar si las regiones donde se tenían coloraciones intermedias eran producto de hibridación o aislamiento genético (Clark, 2019).

III. JUSTIFICACIÓN

Actualmente el planeta está pasando por una crisis ecológica a nivel mundial causada por presiones que los humanos sometemos al ambiente global como lo son la liberación de gases de efecto invernadero, la deforestación de los bosques y la contaminación generalizada tanto en el suelo como el agua (Barry and Eckerley, 2005). Todos estos factores y sus efectos han provocado un declive significativo en las poblaciones de flora y fauna al grado que muchos ahora se encuentran en peligro de extinción. Si se desea mantener el equilibrio de los ecosistemas actuales es indispensable mantener la biodiversidad lo más estable posible. Guatemala es uno de los países con más biodiversidad del mundo con más de 1000 especies de vertebrados, entre ellos 145 especies de anfibios (Amphibian Ark, 2017). Lastimosamente Guatemala no es la excepción en esta crisis ambiental, ya que su biodiversidad es igualmente amenazada teniendo un 14% de las especies actuales de vertebrados en categorías de amenaza de extinción (CONAP, 2021). Es importante resaltar que el país, en general, carece de estudios con respecto del tamaño poblacional, extensión de rango, diversidad y otros factores ecológicos para muchas de las especies que habitan el país por lo que el número de especies amenazadas podría ser mucho mayor.

Entre los grupos de biodiversidad más afectados a nivel mundial resaltan los anfibios con un 67% de las especies a nivel mundial con sus poblaciones en decrecimiento, 32% están amenazados de extinción y 23% carecen de los datos suficientes para ser categorizados según la lista de especies amenazadas de la IUCN. Las causas de esta disminución poblacional son varias, entre ellas la pérdida de hábitat debido al avance de la frontera agrícola, la contaminación de los cuerpos de agua, introducción de especies invasoras y el surgimiento de enfermedades infecciosas como es el caso de la quitridiomycosis. México y Centro América es una región con un alto índice de biodiversidad y endemismo en el grupo de los anfibios, con más del 15% del total de especies de anfibios en esta región (Bishop, et al., 2012).

Cabe resaltar que la categorización de amenaza dada por la IUCN no siempre refleja el estado de las especies en regiones específicas de su distribución ya que la categorización se realiza en base de su estado poblacional a lo largo de su distribución. Como es el caso de

Agalychnis moreletii la cual actualmente se categoriza en preocupación menor, sin embargo, la abundancia de esta especie varía según las regiones en las cuales se encuentra distribuida. Diferenciar las poblaciones de una especie como es el caso en esta investigación es una herramienta importante en cualquier plan de conservación enfocado en *A. moreletii*. Esto se debe a que los resultados de esta investigación podrían revelar poblaciones con suficientes diferencias genéticas para ser separado como una nueva especie, alelos únicos que no se presentan en otras poblaciones o bien, poblaciones que podrían ser agrupados entre ellas a la hora de plantear un plan de conservación. De no tener esta información, planes de conservación tendrían un gran vacío de conocimiento en el momento que se busque darle prioridad a las poblaciones más significativas.

IV. OBJETIVOS

A. Objetivo general:

Determinar las diferencias a nivel filogenético y morfométrico entre poblaciones de *Agalychnis moreletii* a lo largo de su distribución.

B. Objetivos específicos:

- Establecer diferencias genéticas en las poblaciones de *A. moreletii* con marcadores moleculares de los genes 16S y CytB.
- Determinar diferencias morfométricas en poblaciones de *A. moreletii* utilizando medidas corporales.
- Formar grupos de manejo conforme las relaciones determinadas con los análisis filogenéticos y morfométricos.

V. MARCO TEÓRICO

A. Genética de la conservación

Convencionalmente los factores que se toman para evaluar el estado de conservación de una especie están relacionados con el rango de distribución, el tamaño poblacional y la frecuencia con la que se observan individuos en sus hábitats. Sin embargo, a pesar de que estos factores den un indicio, no toman en cuenta aspectos esenciales que determina la salud de una población (Gillespie, et al., 2011). Es por ejemplo el caso de la diversidad genética, la cual se define como la variación de alelos existente dentro de una población (Ellegren & Galtier, 2016). La misma es importante debido a que esta variación alélica está ligada con la capacidad de una especie a evolucionar y a adaptarse a los cambios en su ambiente, es decir a mayor diversidad genética, mayor es la capacidad de adaptación. Tomando esto en cuenta se puede determinar como el tamaño poblacional es un factor positivo al referirnos a la salud de una especie solo si hay una alta diversidad genética en la población, de lo contrario cualquier cambio en el ambiente podría resultar en un alto riesgo de extinción para la población en general independientemente del número de individuos que existan (Loeschcke, et al., 2013).

Dentro de la genética de la conservación existen otros factores aparte de la diversidad genética que dan un indicio sobre la salud de las poblaciones de una especie, entre estos se encuentran la depresión endogámica, el flujo genético entre poblaciones, el establecimiento de unidades de manejo en una especie, entre otros. Todos estos factores pueden ser tomados dentro de planes de conservación al momento establecer el enfoque de las acciones a tomar. Una de las áreas de conservación en las que la genética ha tenido un gran impacto es en los proyectos con poblaciones en cautiverio (Ouborg, et al., 2010; Frankham, 2003). Anteriormente muchas iniciativas para conservar especies utilizando poblaciones en cautiverio solían con el paso del tiempo fracasar debido a una disminución en la fertilidad en las poblaciones o un incremento en la tasa de abortos espontáneos. Con la introducción de las herramientas moleculares en esta área, se fue vinculando estos fenómenos con la ocurrencia de endogamia, la cual se define como el intercambio de material genético entre individuos emparentados a lo largo de generaciones. Con esta evidencia estos planes se

vieron en la necesidad de introducir individuos de otras poblaciones en cautiverio o nativas con el fin de incrementar la diversidad genética en la población y reducir este fenómeno (Frankham, 2005).

El impacto inmediato que ha tenido el uso de la genética en la conservación de especies *ex situ* se debe a que una de las presiones negativas que más afecta a esta técnica de conservación solo puede ser observado y evaluado a través de la genética, siendo esta la depresión endogámica. Este fenómeno es tan prevalente en las técnicas *ex situ* debido a la falta de flujo genético consecuente del aislamiento que implica conservar a una especie fuera de su ambiente (Witzenberger & Hochkirch, 2011). Con respecto a las técnicas de conservación *in situ*, las mismas tienen la característica de tener una mayor variedad de factores que pueden afectar a las poblaciones objetivo por lo que el impacto del uso de la genética no es tan claramente, ni inmediatamente tan observable como lo es en poblaciones *ex situ*. Sin embargo, evaluar a las poblaciones *in situ* en aspectos genéticos suele conllevar un espectro más amplio sobre la salud y factores adversos en las poblaciones (Allendorf, et al., 2010).

1. Ecología molecular

La ecología molecular es un campo moderno dentro de la ecología la cual busca complementar la información obtenida con el comportamiento, morfología y presencia de las especies en sus ecosistemas con información obtenida a través del material genético con el fin de conocer la diversidad y relación entre poblaciones de la especie. La integración de técnicas moleculares en la ecología empieza con el descubrimiento y optimización de procesos durante los años 80 y 90 que permiten la obtención de secciones específicas en el genoma a través de regiones en genes como mitocondriales y nucleares de individuos de una población en masa y a costos cada vez menores (Freeland, 2020). A su vez el avance en las técnicas para secuenciar esta información genética en un orden específico de los cuatro componentes químicos que conforman el ADN (Adenina, Timina, Guanina y Citosina) durante los últimos 20 años, permiten la aplicación de esta información genética. La integración de información genética en la variedad de problemas que le corresponden a los estudios ecológicos expande

de gran manera aspectos como los límites poblaciones, patrones de migración y el flujo de genes entre poblaciones. Estos nuevos conceptos que extienden los aspectos que se pueden describir de una especie hace que esta información se use como herramienta para diferentes tipos de planes de conservación de especies como son los corredores biológicos, translocaciones de individuos, entre otros (Schierwater, et al., 2013).

B. Genética y diferenciación de poblaciones.

La diferenciación de las poblaciones de especies u otros grupos taxonómicos ha sido uno de los principales objetivos desde que surge la necesidad de clasificar la biodiversidad de manera taxonómica. Una población se define como una agrupación de individuos de una especie que comparten un mismo pool genético, hábitat y se encuentran total o parcialmente aislados de otras agrupaciones en términos reproductivos. A lo largo del tiempo se han utilizado varios métodos y reglas para determinar las relaciones entre las poblaciones. A partir de los avances tecnológicos en la rama de la biología molecular y genética, se han desarrollado diversos métodos que nos permiten determinar las relaciones a nivel genético de las poblaciones y así, tener un entendimiento más amplio de las relaciones interpoblacionales que no se puede lograr bajo ningún método previo. La rama de la genética encargada del estudio de las poblaciones de una especie es llamada genética de poblaciones, la cual busca describir la variación y conformación alélica para explicar fenómenos evolutivos tales como la diversificación de las especies. Las poblaciones estudiadas bajo la genética de poblaciones deben estar sujetas a cambios genéticos influenciados por presiones evolutivas como la selección natural, deriva genética, flujo genético, mutación y recombinación (Bengtsson, et al., 2017; Hamilton, 2021).

A partir de la descripción de la variación alélica en las poblaciones es posible establecer qué tan diversas son las poblaciones de una especie, cuantificar las cercanías o diferencias entre estas, de qué forma se mantiene la variación genética, determinar los alelos que generan los fenotipos responsables de las diferencias interpoblacionales, entre otros (Cutter, 2019). Los métodos moleculares utilizados para determinar los fenómenos anteriormente mencionados son numerosos y dependientes del tipo de marcador molecular utilizado en la amplificación del material genético. Dentro de los marcadores más utilizados

dentro de la genética de poblaciones se encuentran los microsatélites los cuales permiten observar el comportamiento genético en una amplia resolución, los mismo son de gran utilidad para determinar aspectos relacionados a la estructura poblacional y permiten la cuantificación de la conectividad entre poblaciones mediante la determinación del flujo genético entre ellas (Sunnucks, 2000). Otro tipo de marcadores moleculares utilizados en esta rama de la genética son los marcadores de genes mitocondriales. Entre ellos, se encuentran los utilizados en esta investigación, siendo los marcadores para las regiones 16S y Citocromo B. Estas regiones mitocondriales cumplen con ser regiones conservadas en el genoma lo cual permite establecer relaciones claras entre taxones. La información propiciada por estos marcadores permite la determinación de relaciones filogenéticas a partir de métodos que relacionan los taxones o reconstruyen las relaciones taxonómicas como lo son los árboles filogenéticos (Valentini, et al., 2009; Fazekas, et al., 2012).

C. Diferenciación morfológica de poblaciones.

La morfometría es una de las herramientas clásicas que se han utilizado para diferenciar poblaciones en diferentes especies mediante el análisis estadístico de la similitud o variación de diferentes características morfológicas de una muestra significativa de los individuos de las poblaciones en cuestión. Debido a la facilidad de su aplicabilidad, la morfometría ha sido la herramienta más utilizada para diferenciar taxones desde que inicia la tendencia de clasificar taxonómicamente la biodiversidad. Entre las diferentes características morfológicas a medir se encuentran las características cualitativas y la cuantitativas. En lo que respecta el análisis morfométrico de individuos del orden Anura, se establecen como características cualitativas aquellas relacionadas a la coloración de los individuos, patrones en la piel, coloración de los ojos, entre otros. Las características cuantitativas son todas aquellas que precisan de una medición numérica, en el caso de grupo de las ranas, las medidas estándar para determinar diferencias entre poblaciones podrían ser la distancia entre el hocico y la cloaca, el largo de la falange del cuarto dígito, la distancia interorbital, entre otros (Lee, 1982; Watters, et al., 2016).

D. *Agalychnis moreletii* (Duméril, 1853)

La rana de Morelet o *Agalychnis moreletii* es un miembro de la subfamilia Phyllomedusinae dentro de la familia Hylidae. *A. moreletii* tiene una amplia distribución abarcando el sureste de México, norte y sur de Guatemala, Belice, y el oeste de Honduras y El Salvador. Su distribución tan amplia se debe a la capacidad de esta rana para habitar en un rango altitudinal amplio (200 – 2130 msnm), en varios tipos de bosque tropicales húmedos desde bosques de tierras bajas hasta bosques montanos. *A. moreletii* también puede ser observada en humedales tanto permanentes como estacionales y presenta cierta capacidad de resiliencia ante la contaminación ya que puede encontrarse en bosques dentro o cerca de tierras de cultivo (Koehler, 2013). La rana de Morelet está clasificada como de preocupación menor, debido a su extensa distribución y su relativa abundancia en ciertas partes de su distribución, sin embargo, actualmente su estado poblacional se clasifica como en disminución debido a la continua pérdida de sus hábitats debido el crecimiento de la frontera agrícola, la presencia de especies invasoras y por contaminación de cuerpos de agua por productos relacionado a agricultura (IUCN, 2017). *A. moreletii* es una de las especies que probablemente sufrió una gran disminución poblacional causada por la enfermedad quitridiomycosis generada por un hongo patógeno dérmico llamado *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), se sospecha que es por esto por lo que la rana de Morelet es más habitualmente observada en las laderas de las montañas donde el hongo disminuye su efectividad debido a la disminución en la temperatura debido al aumento altitudinal. Actualmente existe evidencia que los individuos de *A. moreletii* podrían tener actualmente cierta resistencia a la enfermedad quitridiomycosis como se observó en ensayos clínicos realizados en poblaciones de México (Caviedes-Solis et al., 2015; Frias-Alvarez, P et al., 2008).

A. moreletii en su fase adulta puede llegar a medir hasta 64 mm desde su hocico hasta su cloaca, no existe dimorfismo sexual entre machos y hembras, sin embargo, las hembras suelen ser más grandes en relación con los machos. La rana de Morelet se distingue de otras especies de *Agalychnis* por su costado y membrana interdigital de los primeros 3 dígitos de la mano y los primeros 4 de la pata de color naranja y su iris de un rojo marrón o morado

oscuro. Los renacuajos de esta especie suelen distinguirse por su cola la cual es dos veces el tamaño del cuerpo, y requieren de agua dulce, sin embargo, es posible observarlos en cuerpos de agua contaminados. A pesar de estar categorizada como de preocupación menor, no todas las poblaciones de *A. moreletii* presentan una gran abundancia de individuos como es el caso de las poblaciones de El Salvador donde no es tan común encontrarse con un individuo o las poblaciones parchadas en Guerrero, Chiapas, Veracruz en México donde existe una gran disminución poblacional por el hongo Bd (Kubicki, 2015; Koehler, 2013).

2. METODOLOGÍA

A. Sitios de estudio y obtención de las muestras

El muestreo de individuos de *Agalychnis moreletii* se realizó durante la época lluviosa del 2016, 2017 y 2018 en varias localidades de México, Guatemala, Belice, Honduras y El Salvador (Figura 1). Este fue realizado por estudiantes de doctorado de la Universidad Metropolitana de Manchester. El muestreo se realizó entre las 19:00 y 23:00h utilizando el método de muestreo por encuentro directo (VES). Todos los individuos colectados fueron manipulados con guantes estériles de látex y fueron colocados en bolsas plásticas de colecta identificadas con sus respectivos códigos. La colecta del material genético de los individuos se realizó mediante raspados bucales utilizando un sterile rayon swab (MW113, Medical Wire Equipment & Co. Ltd), el cual fue preservado en un tubo de 1.5 mL en etanol absoluto. En algunas poblaciones se colectaron entre 2 y 3 individuos por población, el proceso de eutanasia se llevó a cabo sumergiendo a los individuos en una solución de lidocaína. A los individuos colectados se le extrajo su hígado y se preservó en etanol absoluto. Posteriormente, se fijaron los individuos en formalina 10% y se almacenaron en Colecciones Biológicas de Referencia o Museos en cada uno de los países en los que se trabajó.

Muestras de tejidos de hígado o músculo de poblaciones en Guerrero y Veracruz, México fueron obtenidas de colectas históricas preservadas en la Universidad de Texas. Estas fueron extraídas y amplificadas en la Universidad del Valle de Guatemala.

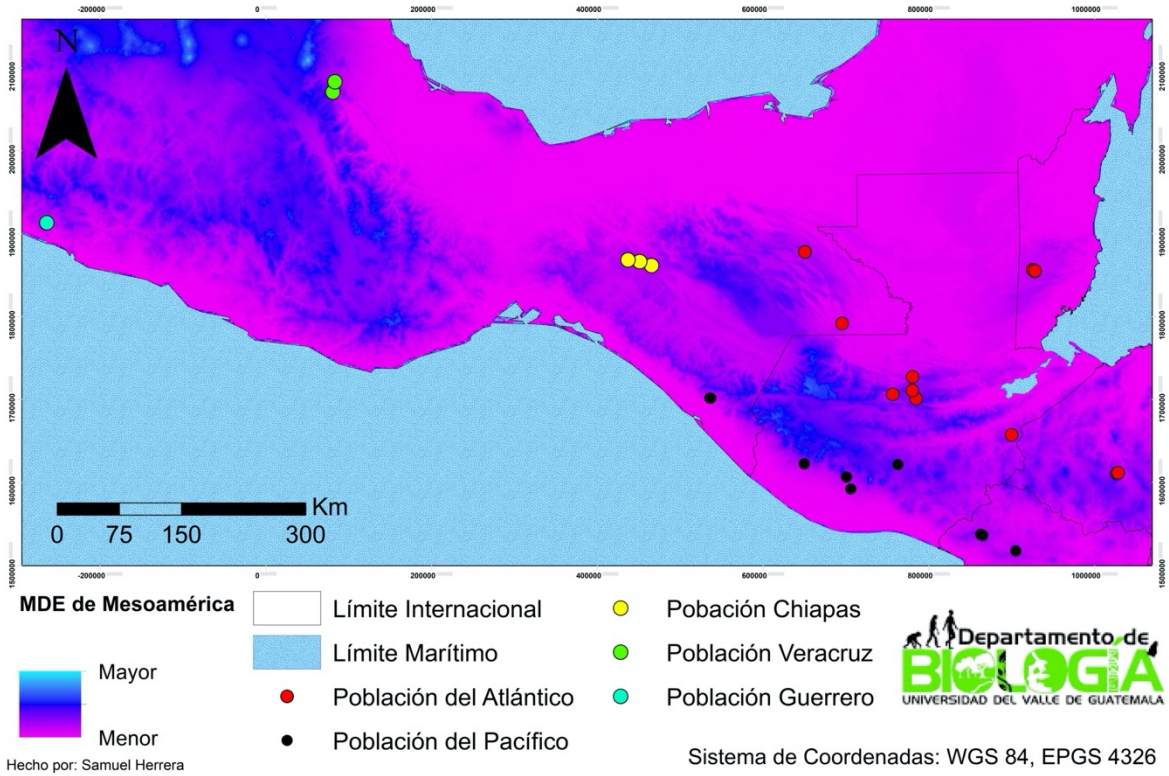


Figura 1. Mapa de las ubicaciones geográficas de las poblaciones de *A. moreletii* muestreadas en el presente estudio. Donde las diferentes poblaciones se diferencian por el código de colores representado en la sección inferior de la figura. Variación de color en el territorio corresponde al cambio de altitud en la región siendo purpura la regiones más bajas y azul las más altas.

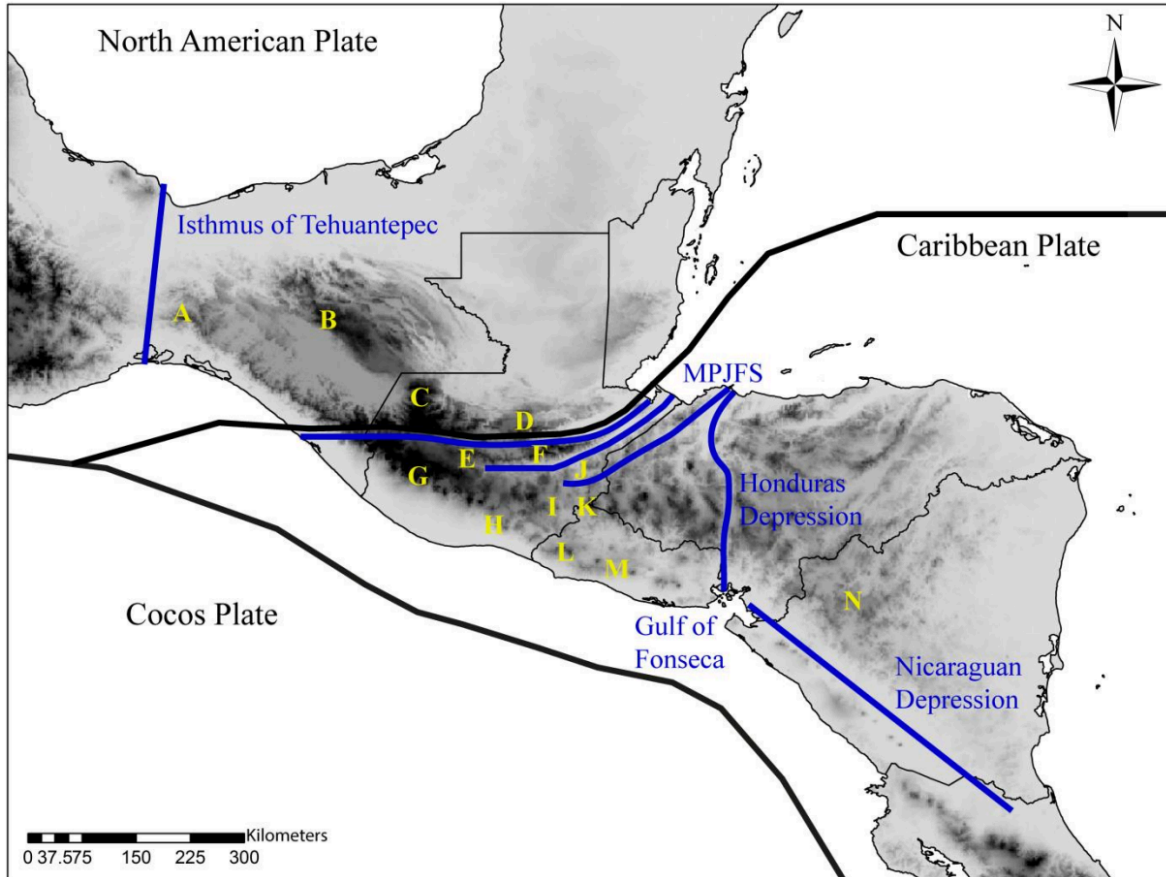


Figura 2. Mapa de la región central de Centroamérica y áreas geográficas representativas de la zona (Jimenez, 2021). El cambio de tonalidad de negro representa la altitud de la región siendo los tonos pálidos los de menor altitud y los tonos oscuros los de mayor altitud. A – Sierra Atravesada; B – Altos de Chiapas; C – Sierra de los Cuchumatanes; D – Sierra de Chamá; E – Sierra de Chuacús; F – Sierra de las Minas; G – Cadena volcánica del Pacífico; H – Volcán Tecuamburro; I – Volcán Suchitán; J – La Unión, Zacapa; K – Cerro Montecristo; L – Volcán Santa Ana; M – Volcán San Vicente; N – Cordillera Dariense.

B. Procedimientos

1. Amplificación de código de barras

El ADN obtenido de las muestras se amplificó para dos regiones mitocondriales, 16S y CytB (Cuadro 1).

Cuadro 1. Cebadores utilizados como marcadores moleculares para diferenciar los individuos de las diferentes poblaciones de *A. moreletii*.

Primer	Secuencia	Tamaño de producto	T. anillamiento	Referencia
MVZ 15	GAACTAATGGCCCACACWWTACGNAA	850	46° C	Moritz, et al., 1992
MVZ 16	AAATAGGAAATATCATTCTGGTTTAAT	850	46° C	Moritz, et al., 1992
16SA-L	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	550	52° C	Palumbi, 1991
16SB-H	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	550	52° C	Palumbi, 1991

Se utilizó la siguiente receta y programa (cuadros 2 y 3) para la amplificación de los genes de interés.

Cuadro 2. Reactivos y cantidades por usar para la amplificación para una sola muestra.

Reactivo	Cantidad para una muestra (uL)
Agua up	5
Primer forward	2.5
Primer reverse	2.5
GoTaq polimerasa	12.5
ADN	2.5
Volumen total	25

Cuadro 3. Programa de termociclador para amplificación de regiones de interés.

Ciclos	Paso de programa	Temperatura (°C)	Tiempo
NA	Desnaturalización inicial	95	10 min
35 x	Desnaturalización	95	30 seg
	Anillamiento	*52	30 seg
	Elongación	72	30 seg
NA	Elongación final	72	5 min

En este cuadro se presentan los pasos de programa de termociclador. Donde NA significa No Aplica y * indica que la temperatura de anillamiento dependerá del marcador a usar. Las diferentes temperaturas de anillamiento se ven representadas en el **Cuadro 1**.

Finalmente, el producto del PCR fue visualizado en un gel de agarosa para confirmar la correcta amplificación de las regiones de interés y cuantificado el total de ADN en un espectrofotómetro Nanodrop. Los productos fueron enviados a laboratorios de Macrogen en Corea donde se realizó la limpieza del producto y secuenciación bidireccional de las bases con el método de Sanger.

2. Toma de medidas morfológicas

Todas las ranas verdes de Morelet observadas en las diferentes localidades a lo largo de su distribución fueron identificadas y colectadas del punto donde fueron encontradas. Dentro del campamento todas las ranas que cumplieran con el requerimiento de estar en fase adulta (pérdida total de la cola) fueron medidas utilizando un vernier electrónico. Las medidas tomadas en las ranas fueron las medidas estándar para identificar diferencias morfológicas en anuros (Watters, et al., 2016) (Figura 3). Luego de toma de las medidas y de la muestra con material genético las ranas fueron liberadas en el mismo punto donde fueron colectadas. Medidas extras de especímenes de *A. moreletii* fueron tomadas de ejemplares dentro de la división de Anfibios y Reptiles de la Universidad de Texas, estos especímenes correspondían a individuos encontrados en diferentes localidades de México y Guatemala. Dentro de estas muestras, se encuentran individuos del estado de Oaxaca las cuales fueron posteriormente asignadas a su propio grupo de manejo llamado por el mismo nombre del estado.

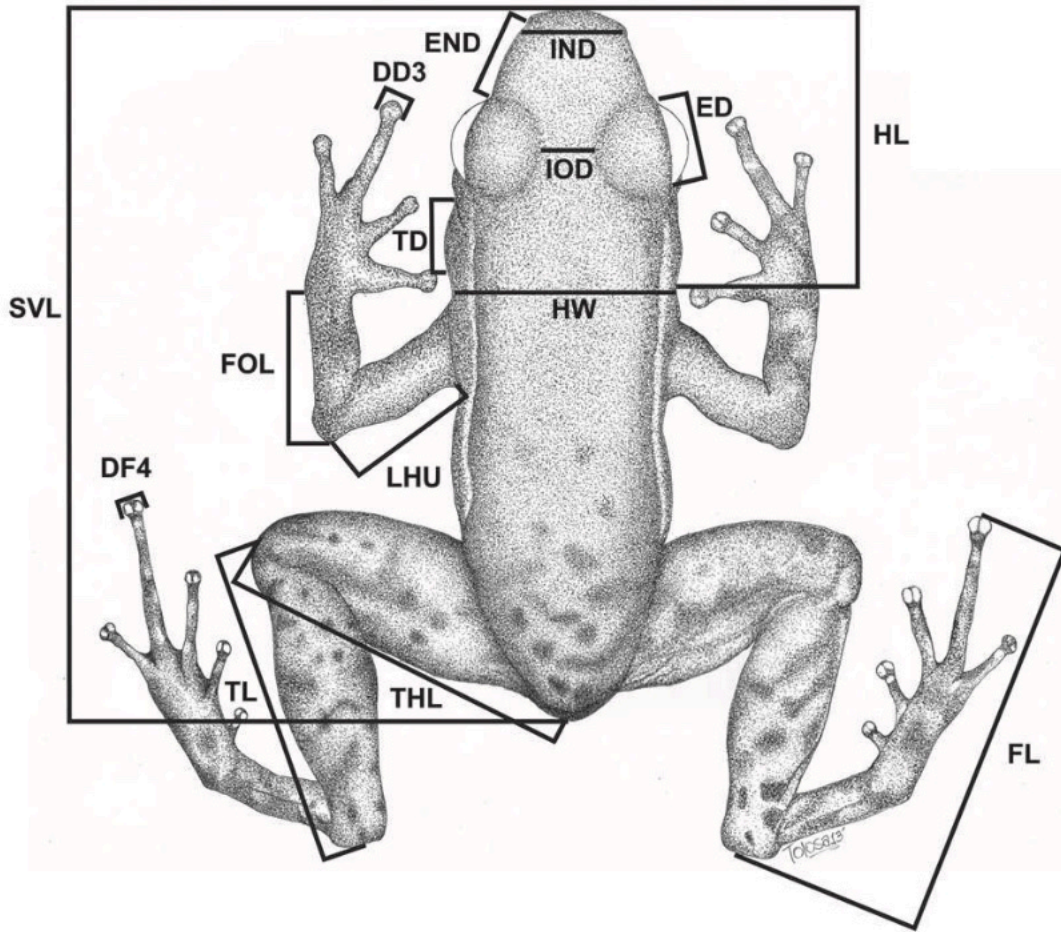


Figura 3. Medidas morfométricas utilizadas para el análisis de diferenciación en la rana *Agalychnis moreletii*, en diferentes localidades a lo largo de distribución. Las medidas tomadas fueron: Distancia entre el hocico y la cloaca = SVL, Largo de la cabeza (HL), Ancho de la cabeza (HW), Diámetro inter-orbital (IOD), Distancia entre nostrilos (IND), Diámetro de ojo (ED), Diámetro del disco del dedo 3 (DD3), Diámetro del disco del dedo 4, patas traseras (DF4), Distancia entre ojo y nostrilo (END), Diámetro del tímpano (TD), Largo del humero (LHU), Largo del antebrazo (FOL), Largo del muslo (THL), Largo de la tibia (TL) y Largo de pata trasera (FL) (Tolosa, et al., 2015).

3. Análisis de datos

a. Análisis datos genéticos

Una vez procuradas las secuencias para los genes 16S y Citocromo B de los individuos de *A. moreletii* obtenidas a lo largo de su distribución, se procedió a limpiar las secuencias y alinearlas según las regiones de donde fueron obtenidas utilizando la plataforma de software bioinformático Geneious. Utilizando la misma plataforma se tomaron los dos sets de secuencias alineadas para ambos genes mitocondriales y se obtuvo un alineamiento con las secuencias de ambos marcadores concatenadas. Con los tres alineamientos de secuencias, se procedió a construir tres filogenias utilizando diferentes métodos para establecer las relaciones entre las diferentes poblaciones de *A. moreletii* y determinar si existen muestras de localidades distintas que se agrupen según su similaridad genética y se diferencien de otros grupos. La determinación de estas relaciones permite asignar los diferentes grupos como unidades de manejo o si se presenta las diferencias suficientes, como especies distintas. Uno de los métodos de construcción de árboles filogenéticos utilizados fue el método de Neighbor Joining (NJ), bajo el método de bootstrap con 1000 repeticiones y el método en la plataforma MEGA.

Los métodos restantes utilizados para la construcción de árboles filogenéticos fueron el método de Máxima Verosimilitud (ML), bajo el método de bootstrap con 1000 repeticiones y por inferencia bayesiana, con 100,000,000 de iteraciones. Ambos métodos requerían de un modelo evolutivo para establecer las relaciones filogenéticas de los individuos. Dicho modelo fue obtenido utilizando la plataforma de JModelTest y dicho modelo fue asignados al análisis de las secuencias utilizando un archivo generado con la plataforma Mesquite. Una vez obtenido el modelo para los tres sets de secuencias se procedió a construir el árbol de ML en la plataforma MEGA y el de inferencia bayesiana utilizando la plataforma Mr. Bayes.

Complementando los resultados filogenéticos, se obtuvieron dos variables estadísticas relacionadas con la diversidad genética de las poblaciones muestreadas con el objetivo de representar bajo otros métodos la relación entre ellas. Una de estas variables fue el estadístico ϕ ST utilizando la plataforma DNAsp, dicho estadístico relaciona la cantidad de

variabilidad genética que puede ser explicada por la estructura poblacional designada. Finalmente, el último análisis se dio mediante la construcción de una red de haplotipos para cada uno de los dos marcadores genéticos utilizados en la amplificación del ADN. La construcción de haplotipos se realizó en la plataforma de DNAsp y graficado en la plataforma PopArt.

b. Análisis datos morfométricos

Con la base de datos de las medidas realizadas en individuos de *A. moreletii* en diversos puntos de su distribución y las realizadas a partir de fotografías aportadas por individuos preservados por la Universidad de Arlington, Texas, utilizando la aplicación ImageJ, se utilizó la plataforma de estadística computacional R para elaborar diversos estadísticos que relacionen las medidas tomadas con las poblaciones determinadas. Utilizando el paquete de stats (R Core Team, 2012) dentro de la plataforma R se introdujeron los resultados de las medidas de las ranas una por una a un modelo de regresión logística múltiple con el fin de determinar si las medidas están estadística y significativamente relacionadas con la diferenciación de las poblaciones. Para todas las medidas determinadas como significativas al relacionarlo con las poblaciones determinadas, fueron graficadas con un gráfico de violín según los resultados de las medidas con cada una de las poblaciones (Atlántico, Pacífico, Chiapas, Veracruz y Guerrero), utilizando el paquete ggplot2 (Wickman, 2016).

Por otro lado, dentro de la misma plataforma de R se realizaron otros estadísticos con el fin determinar si hay una relación entre todas las medidas tomadas con la diferenciación de las poblaciones. Utilizando el paquete Morphotools2 (Šlenker, et al., 2022) y Ggplot2 se realizaron una cladograma y un gráfico de análisis de componentes principales (PCA). El dendrograma se realizó utilizando el método de agrupamiento UPGMA y el método de distancias Euclidean. Este gráfico se realizó con el fin de determinar si todas las medidas tomadas forman un diagrama en forma de árbol con las mismas diferencias mostradas en los árboles filogenéticos. Adicionalmente, el PCA fue elaborado con el fin de observar cómo se agrupan las distintas poblaciones determinadas con los análisis filogenéticos y determinar la “distancia” entre las mismas.

3. RESULTADOS

Con respecto a los análisis genéticos realizados a partir de muestras de individuos de *Agalychnis moreletii* obtenidas en más de 30 localidades, se obtuvo un total de 154 secuencias con un largo de 595 pb para el gen mitocondrial 16S, 150 secuencias con un largo de 766 pb para el gen mitocondrial Citocromo B (CytB) y 132 secuencias con un largo de 1356 pb del alineamiento concatenado de ambos genes mitocondriales. A partir de estos sets de datos se construyeron tres árboles filogenéticos utilizando los métodos de clustering Neighbor Joining (NJ), Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (MB). Estos árboles filogenéticos se realizaron con el fin de determinar las relaciones, cercanías y diferencias a nivel genético entre las poblaciones de *A. moreletii*. Complementando la reconstrucción filogenética, se obtuvieron indicadores de diversidad para ambos marcadores y se realizó una comparación de esta entre las unidades de manejo establecidas en la reconstrucción mediante el estadístico ϕ_{ST} y con redes de haplotipos. A continuación, se presentan los tres árboles generados a partir de la alineación concatenada de los dos genes mitocondriales, los resultados del estadístico de diversidad genética ϕ_{ST} y la red de haplotipos.

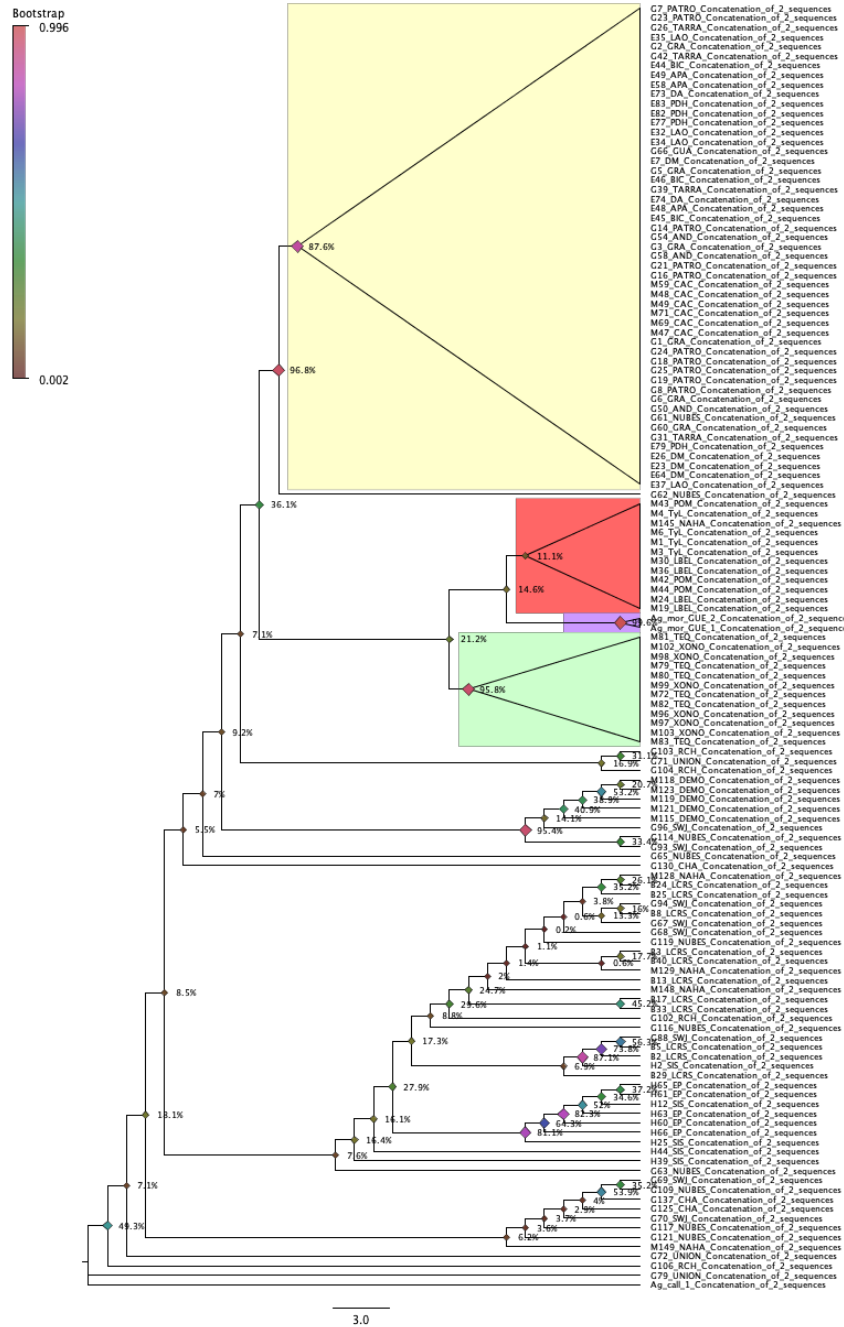


Figura 4. Árbol filogenético construido bajo el método de Neighbor Joining para las secuencias concatenadas de los genes 16S-CytB. Las agrupaciones observadas dentro del árbol se dividen en: población del Atlántico (Ramas negras), Pacífico (col: amarillo, valor de nodo: 87%), Veracruz (col: verde, valor de nodo: 95%), Chiapas (col: rojo, valor de nodo: 11%) y Guerrero (col: morado, valor de nodo: 99%). El valor de los nodos se encuentra dentro del rango de 0% a 100%, siendo el valor una representación porcentual del total de coincidencias en la posición de nodos en las diferentes iteraciones.

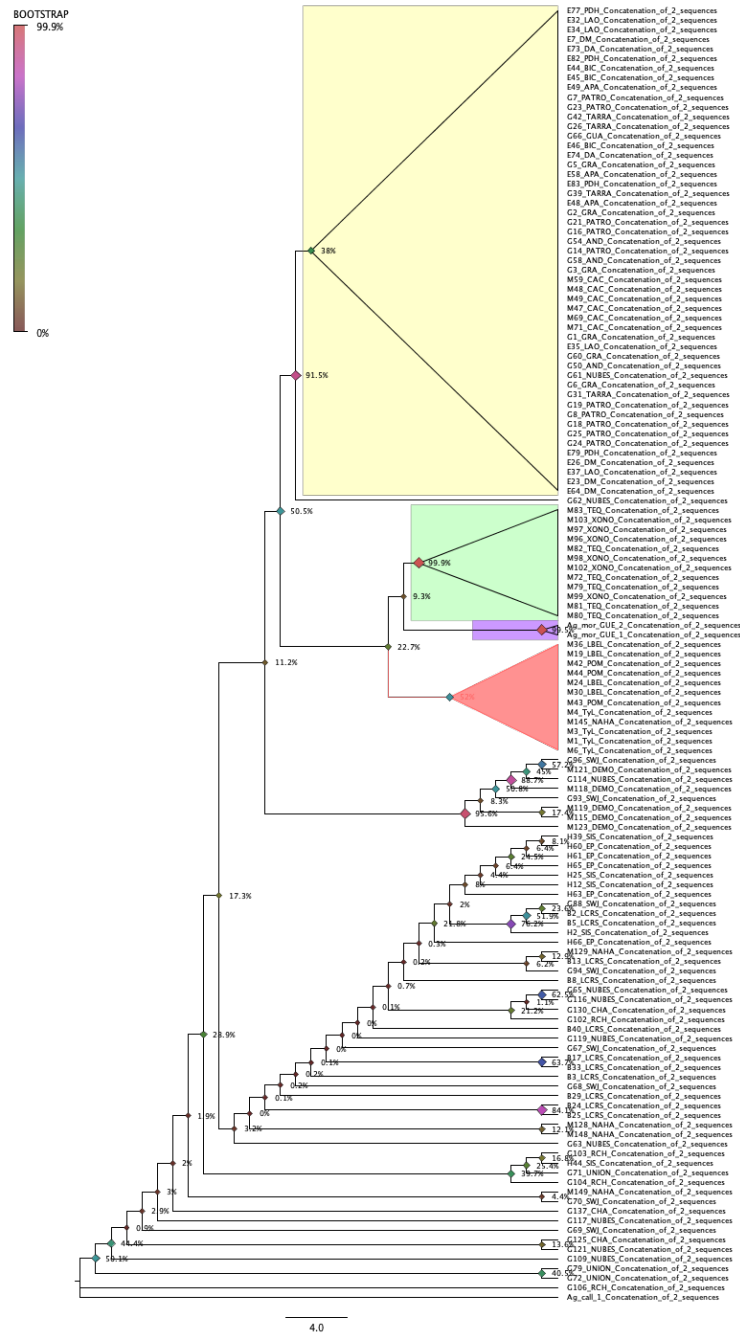


Figura 5. Árbol filogenético construido bajo el método de Máxima Verosimilitud para las secuencias concatenadas de los genes 16S-CytB. Las agrupaciones observadas dentro del árbol se dividen en: población del Atlántico (ramas negras), Pacífico (col: amarillo, valor de nodo: 38%), Veracruz (col: verde, valor de nodo: 99%), Chiapas (col: rojo, valor de nodo: 52%) y Guerrero (col: morado, valor de nodo: 99%). El valor de los nodos se encuentra dentro del rango de 0% a 100%, siendo el valor una representación porcentual del total de coincidencias en la posición de las ramas en las diferentes iteraciones.

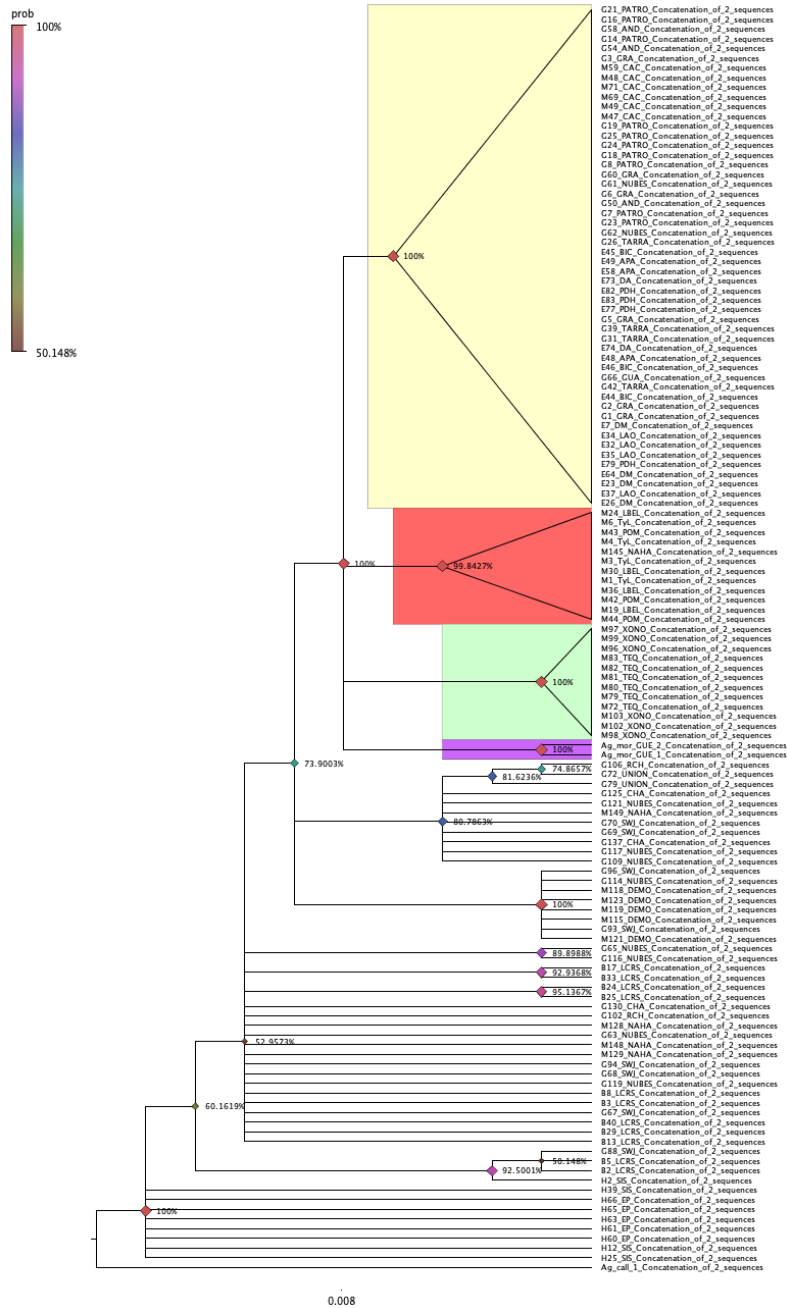


Figura 6. Árbol filogenético construido bajo el método de Inferencia Bayesiana para las secuencias concatenadas de los genes 16S-CytB. Las agrupaciones observadas dentro del árbol se dividen en: población del Atlántico (ramas negras), Pacífico (col: amarillo, valor de nodo: 100%), Veracruz (col: verde, valor de nodo: 100%), Chiapas (col: rojo, valor de nodo: 99%) y Guerrero (col: morado, valor de nodo: 100%). El valor de los nodos se encuentra dentro del rango de 0% a 100%, siendo el valor una representación porcentual del total de coincidencias en la posición de las ramas en las diferentes iteraciones.

Cuadro 4. Matriz de valores de estadístico ϕ_{ST} de diversidad genética para las cinco unidades establecidas dentro de la especie *A. moreletii* obtenidas a partir del marcador mitocondrial Citocromo B (CytB).

ESU	ATL	PAC	GUE	CHA	VER
ATL		0.8955	0.7888	0.5980	0.9285
PAC	0.8955		0.8378	0.9349	0.9897
GUE	0.7888	0.8378		0.7930	0.8788
CHA	0.5980	0.9349	0.7930		0.9666
VER	0.9285	0.9897	0.8788	0.9666	

En el presente cuadro se expresa el valor del estadístico ϕ_{ST} al comparar cada una de las unidades de significancia evolutiva (ESU) establecidas por el análisis filogenético. Valores se presentan en un rango de 0 a 1 donde 0 es el valor que expresa la mayor similitud entre las unidades y 1 el valor que expresa la mayor diferencia entre estas. Las unidades son: ATL: Atlántico, PAC: Pacífico, GUE: Guerrero, CHA: Chiapas y VER: Veracruz.

Cuadro 5. Matriz de valores de estadístico ϕ_{ST} de diversidad genética para las cinco unidades establecidas dentro de la especie *A. moreletii* obtenidas a partir del marcador mitocondrial 16S.

ESU	ATL	PAC	GUE	CHA	VER
ATL		0.5807	0.7635	0.5134	0.7078
PAC	0.5807		0.9023	0.2611	0.8231
GUE	0.7635	0.9023		0.7386	1.000
CHA	0.5134	0.2611	0.7386		0.6224
VER	0.7078	0.8231	1.000	0.6224	

En el presente cuadro se expresa el valor del estadístico ϕ_{ST} al comparar cada una de las unidades de significancia evolutiva (ESU) establecidas por el análisis filogenético. Valores se presentan en un rango de 0 a 1 donde 0 es el valor que expresa la mayor similitud

entre las unidades y 1 el valor que expresa la mayor diferencia entre estas. Las unidades son: ATL: Atlántico, PAC: Pacífico, GUE: Guerrero, CHA: Chiapas y VER: Veracruz.

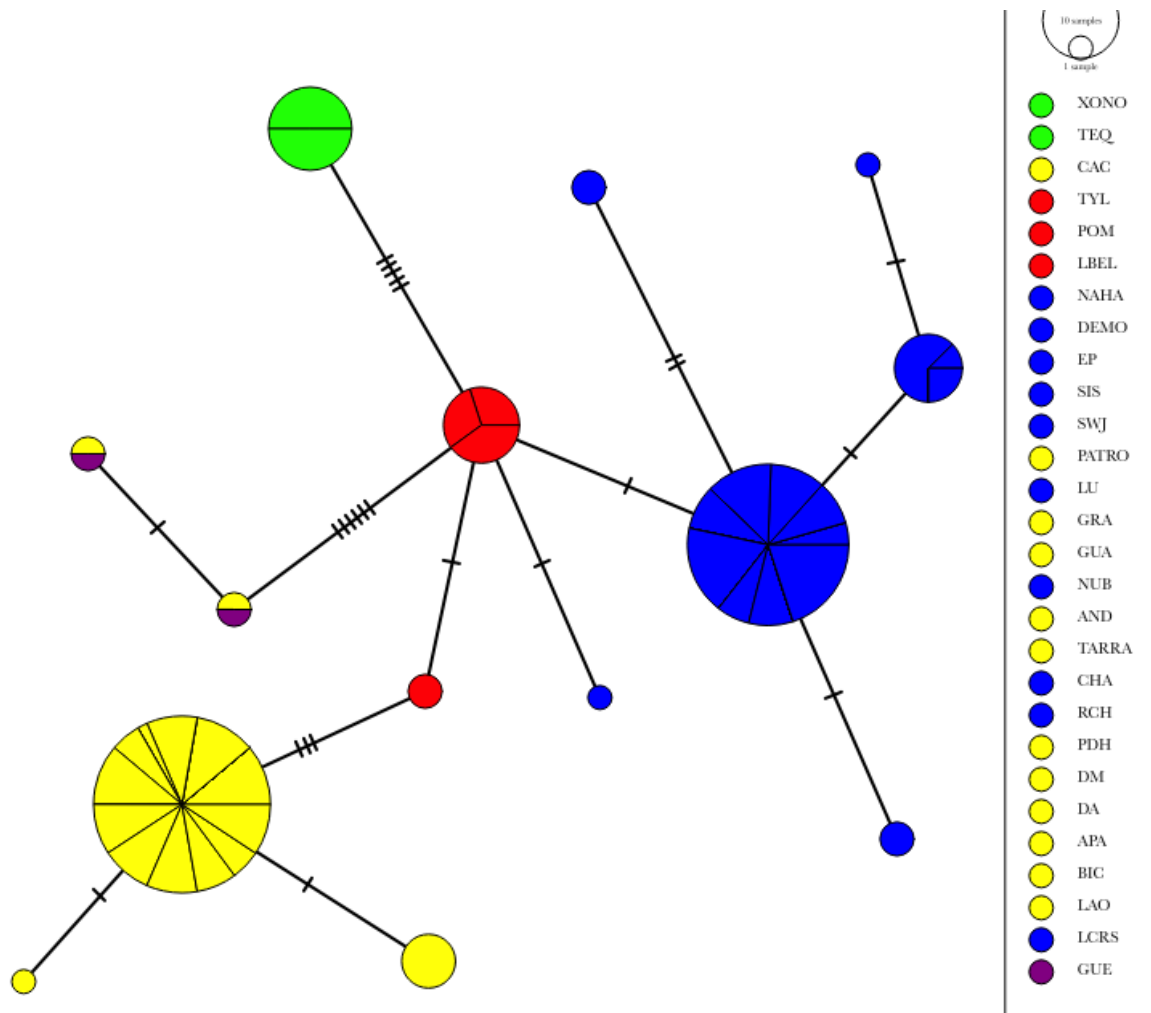


Figura 7. Red de haplotipos elaborada a partir de las 150 secuencias para el marcador molecular Citocromo B (CytB) agrupadas según las unidades de significancia evolutiva (ESU) establecidas. Las unidades se ven representadas según un código de color siendo: población del Atlántico (col: azul), Pacífico (col: amarillo), Veracruz (col: verde), Chiapas (col: rojo) y Guerrero (col: morado).

En cuestión del análisis morfométrico las muestras se dividieron en grupos asignados según las poblaciones genéticas observadas en los resultados filogenéticos. El análisis consistió en pruebas estadísticas con el fin de determinar si alguna característica medida se relaciona con las poblaciones genéticas. Cada una de las características medidas fueron introducidas a un modelo linear generalizado comparándolas con las poblaciones asignadas por los análisis filogenéticos, el resultado de los valores p del modelo para las características que son significativamente diferentes entre ESU se encuentran en el Cuadro 6. Adicionalmente para todas las medidas significativas resultantes del modelo generalizado fueron graficadas según los ESUs en gráficos de violín, de los cuales los tres más representativos se encuentran en esta sección y el resto dentro de los anexos. Tomando los resultados de todas las medidas integradas, se realizó un gráfico de análisis de componentes principales (PCA) en la Figura 9 y un dendrograma Figura 8.

Cuadro 6. Resultado de valores p significativos (<0.05) del modelo de regresión logística múltiple al comparar las medidas de individuos de la rana *A. moreletii* con las agrupaciones designadas según los resultados filogenético.

Medida	Valor p, <0.05
Distancia entre nostrilos (IND)	3.84×10^{-5} ***
Largo del húmero (LHU)	8.36×10^{-5} ***
Largo del antebrazo (FOL)	0.0001***
Ancho de cabeza (HW)	0.0001***
Largo del muslo (THL)	0.01*
Diámetro del disco del dígito 4, patas traseras (DF4)	0.017*
Diámetro del tímpano (TD)	0.04*

En el presente cuadro se muestran todas las medidas que obtuvieron un valor p significativo para explicar las diferentes agrupaciones vistas en el análisis filogenético. Las poblaciones asignadas a los individuos de *A. moreletii* son: Atlántico, Pacifico, Veracruz, Guerrero y Chiapas. La columna de los valores p se presentan los siguientes símbolos, * valores menores a 0.05, ** valores menores a 0.005 y *** valores menores a 0.0005.

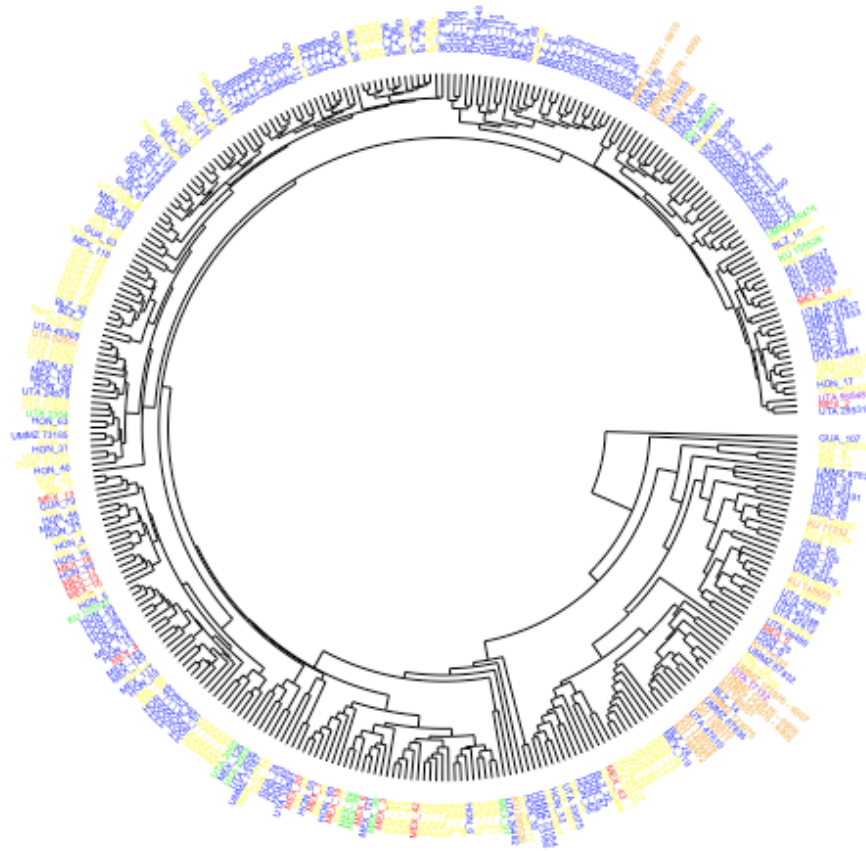


Figura 8. Dendrograma formado a partir de la relación de las 15 medidas morfométricas y las muestras de diferentes localidades a lo largo de la distribución de *A. moreletii*. Coloración de las muestras indica el grupo asignado a partir de los análisis filogenéticos y un grupo extra. Atlántico (Azul), Pacífico (Amarillo), Veracruz (Verde), Guerrero (Morado), Oaxaca (Anaranjado) y Chiapas (Rojo).

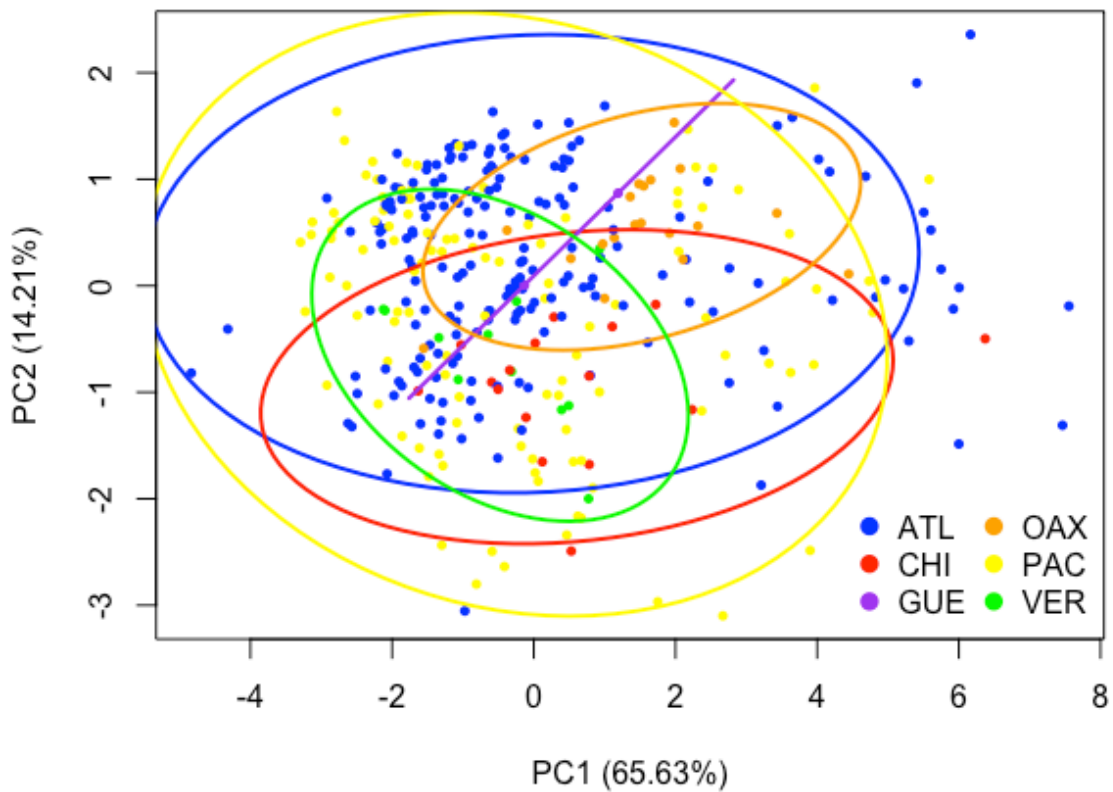


Figura 9. Gráfico de análisis de componentes principales (PCA) construido a partir de la relación de las 15 medidas morfométricas y las muestras de diferentes localidades a lo largo de la distribución de *A. moreletii*. Coloración de las muestras y de las agrupaciones en forma circular indica el grupo asignado a partir de los análisis filogenéticos y un grupo extra. Atlántico (Azul), Pacífico (Amarillo), Veracruz (Verde), Guerrero (Morado), Oaxaca (Anaranjado) y Chiapas (Rojo).

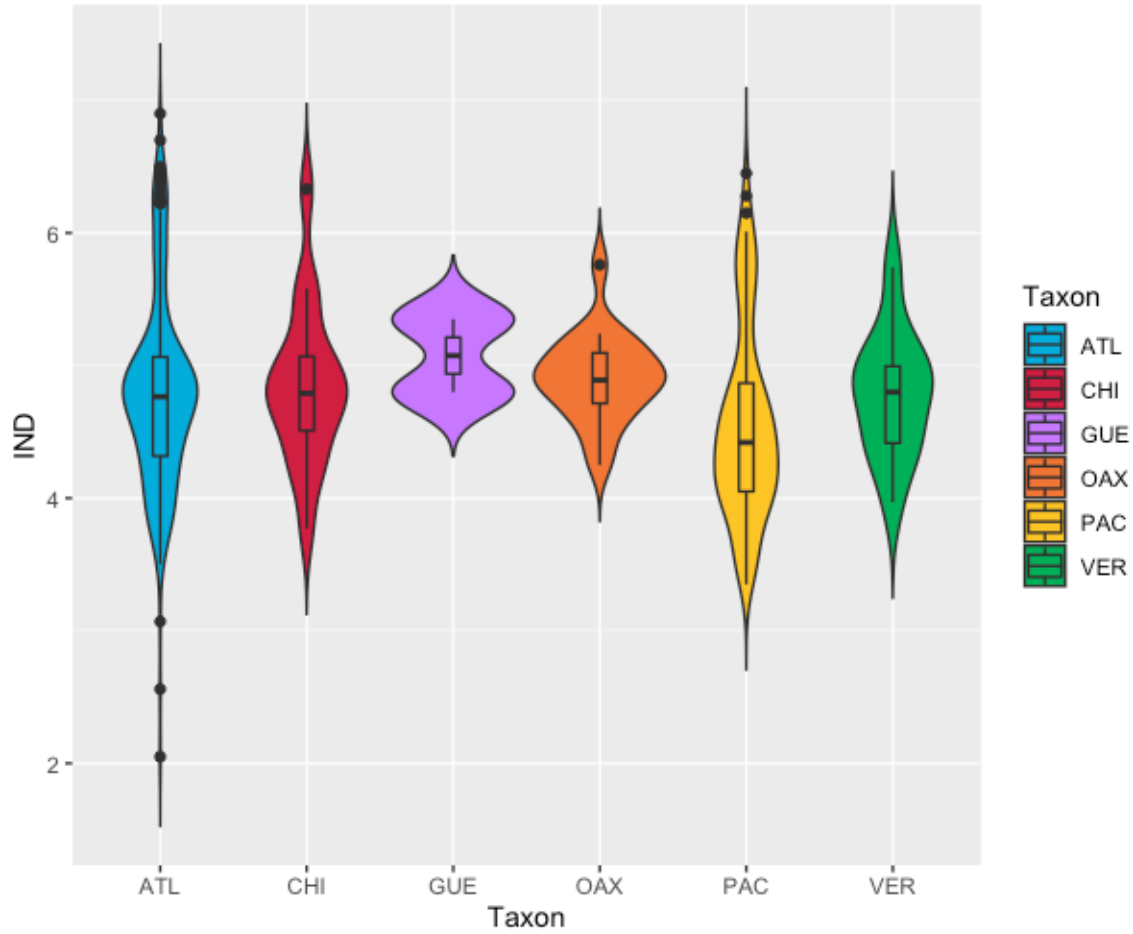


Figura 10. Gráfico de violín para la medida Distancia entre nostrilos (IND) en los individuos de *A. moreletii* en las 6 poblaciones asignadas (Atlántico, Pacífico, Veracruz, Guerrero, Oaxaca y Chiapas).

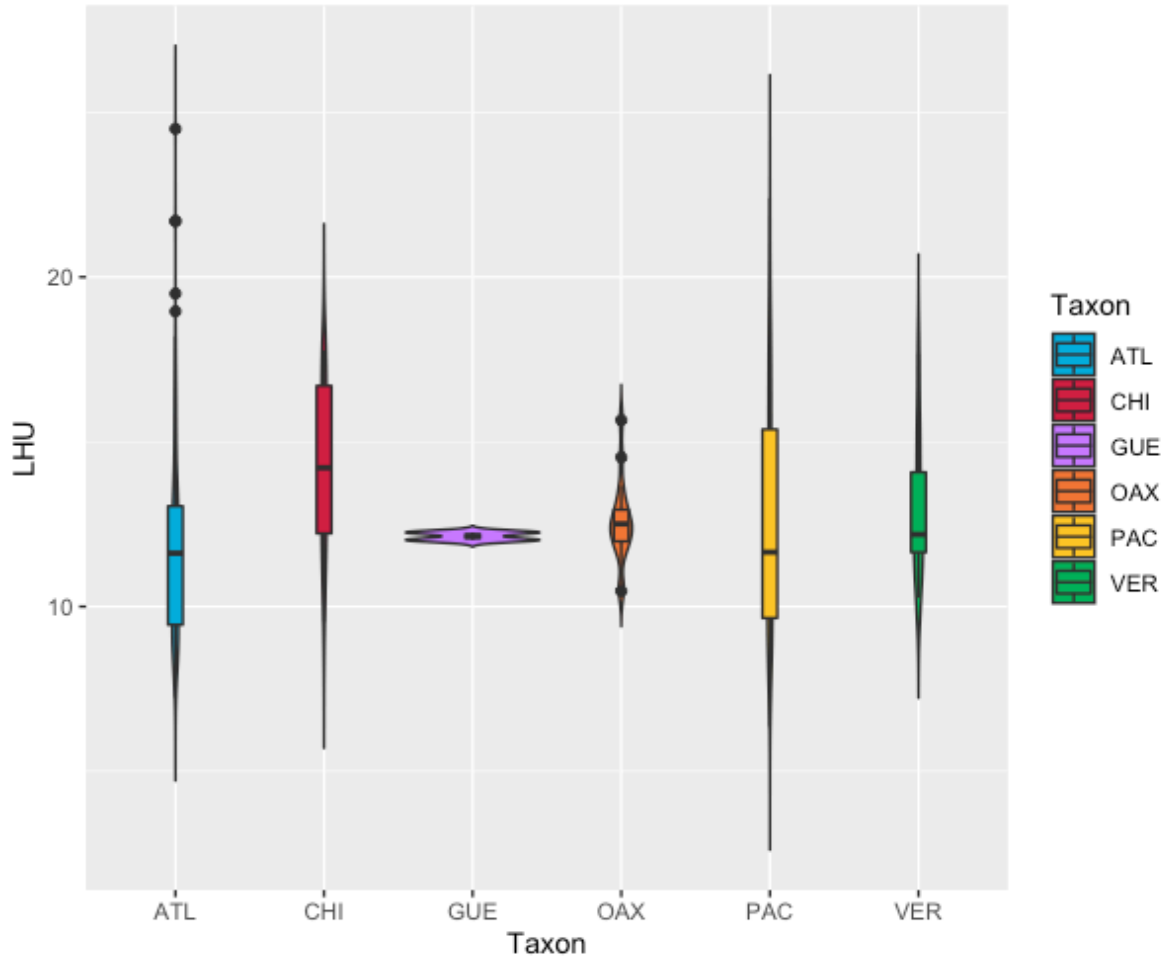


Figura 11. Gráfico de violín para la medida Largo de humero (LHU) en los individuos de *A. moreletii* en las 6 poblaciones asignadas (Atlántico, Pacífico, Veracruz, Guerrero, Oaxaca y Chiapas).

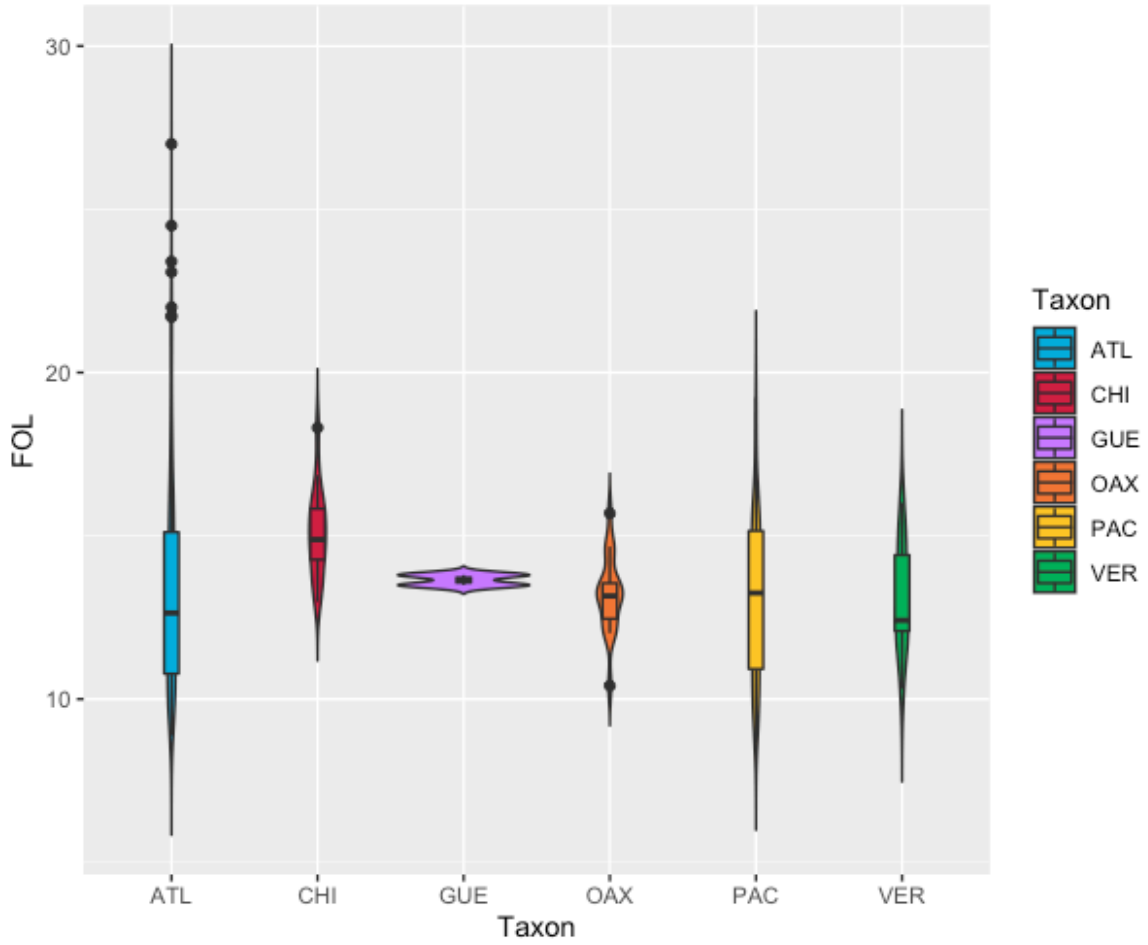


Figura 12. Gráfico de violín para la medida Largo del antebrazo (FOL) en los individuos de *A. moreletii* en las 6 poblaciones asignadas (Atlántico, Pacífico, Veracruz, Guerrero, Oaxaca y Chiapas).

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A. Diferenciación por análisis genético

Con los análisis filogenéticos utilizando las secuencias concatenadas de los genes 16S y Citocromo B podemos observar que los tres árboles construidos bajo diferentes métodos (Figura 4, 5 y 6) presentan una topología similar en la posición de los nodos. El método de inferencia bayesiana resultó en la distribución de ramas más clara y el mayor soporte en los diferentes nodos con un rango de valores entre 100% y 50% de certeza, es decir la probabilidad de que la topología muestre las agrupaciones reales y determine las relaciones entre las poblaciones de *A. moreletii* (Figura 6).

En el último nodo del árbol dentro del grupo designado como Pacífico (cuadro amarillo) se observan las muestras provenientes del sur de Chiapas, la costa de Guatemala y El Salvador. Todas las poblaciones dentro de este nodo se encuentran con un soporte de 100% lo que diferencia con certeza a este grupo del resto de las poblaciones. La diferenciación del grupo Pacífico con el resto de las poblaciones puede explicarse con las barreras geográficas presentes en el área. La Sierra Madre de Chiapas tiene una extensión de aproximadamente 600 km pasando por el mismo estado, al sur de la meseta central en Guatemala y por la división de los territorios hondureños y salvadoreños. Como se puede observar en las figuras 1 y 2, la posición de las poblaciones del grupo Pacífico coinciden en su totalidad con la parte sur de la Sierra Madre explicando las diferencias genéticas con las otras poblaciones producto de la falta de conectividad.

Conforme a los grupos de Veracruz, Guerrero y Chiapas, se puede observar que los tres grupos se encuentran en un lado del nodo que comparten con la población del pacífico con un soporte de nodo del 100%. La cercanía entre los tres grupos se relaciona positivamente con la cercanía geográfica de las localidades a las que pertenecen los grupos. Sin embargo, en los valores de los nodos entre estos grupos podemos observar una clara diferenciación entre los tres, siendo de 100% para el grupo Veracruz, el de Guerrero y 99% de soporte para el nodo Chiapas. La razón para esta separación genética de los tres grupos podría estar fuertemente relacionada con las barreras biogeográficas que divide a estas tres poblaciones.

En el mapa de las localidades muestreadas (Figura 1) se puede observar que estas tres poblaciones se encuentran divididas por el Istmo de Tehuantepec entre Guerrero y Veracruz, Sierra Atravesada entre Guerrero y Chiapas y Los Altos de Chiapas entre los grupos de Chiapas y Veracruz (Figura 2). Las sierras y el istmo representan un cambio altitudinal significativo en la composición geológica del área provocando por ende un cambio en climas y los ecosistemas (Wiens, 2007). Estos cambios altitudinales representan una barrera que le impide a las poblaciones de diferentes localidades intercambiar material genético que en el tiempo provoca una diferenciación en el pool genético de las mismas.

Con respecto al resto de las poblaciones, tanto las secuencias diferenciadas de los grupos Pacífico, Chiapas, Veracruz y Guerrero por el nodo con soporte de 73.9% y las poblaciones segmentadas en los siguientes nodos, son asignados como el grupo Atlántico. Esta asignación se basa en la cercanía geográfica de las poblaciones siendo estas pertenecientes al noreste de Chiapas, el norte de Guatemala, Belice y Honduras y la falta de barreras entre ellas con algunas excepciones. Sin embargo, está falta de claridad en la topología del árbol para el grupo Atlántico denota la necesidad de incorporar al análisis un tamaño mayor de muestra para las localidades presentes y añadir nuevas poblaciones que potencialmente pertenecen a este grupo. La incertidumbre para estas muestras puede observarse no solo en la topología del árbol sino también en el bajo valor de los soportes de los nodos de agrupan a las poblaciones teniendo valores entre 74% y 50%. Las poblaciones separadas por el nodo donde se encuentran el grupo Pacífico fueron agrupadas junto con el resto en el grupo Atlántico y no con ninguno de los grupos del nodo como el de Chiapas debido a las barreras biogeográficas entre las localidades y cada uno de los otros grupos tienen un soporte mayor al 99% siendo poco probable que otra población pueda pertenecer al mismo.

Dentro del grupo Atlántico podemos observar en la parte inferior de la reconstrucción filogenética una serie de muestras pertenecientes al territorio hondureño separadas del resto por un nodo con soporte de 100%. Estas poblaciones de Honduras podrían estar en proceso de diferenciación del resto producto de la separación causada por la barrera propiciada por la falla Motagua-Polochic-Jocotán que separa a Honduras y una parte del departamento de Izabal

de Guatemala del resto de la región guatemalteca. La diferenciación anteriormente propuesta no puede ser establecida con los resultados presentes debido a la falta de claridad en esta sección del árbol siendo una expresión de la misma falta la disposición de las ramas en forma de peine y no como nodos diferenciados. Entre las localidades muestreadas resaltan las poblaciones de Chiapas debido a que, a pesar de pertenecer al mismo territorio político, algunas poblaciones fueron clasificadas dentro del grupo Pacífico, otras dentro de Atlántico y las poblaciones más al noroeste se encuentran en su propio grupo. Estas diferenciaciones son consecuentes de la Sierra Madre y los Altos de Chiapas que dividen al territorio. Tomando lo anterior en cuenta resalta a las poblaciones del territorio de Chiapas como de gran importancia para la diversidad de la especie debido a que presenta significativas diferencias genéticas en sus poblaciones en su área geográfica.

Puntualmente las ranas del género *Agalychnis* son clasificadas como de carácter sedentario debido a sus hábitos arborícolas suelen desplazarse más en los estratos altitudinales del árbol y no tanto en la extensión horizontal de su hábitat. Usualmente habitando un solo cuerpo de agua por generación (Kohler, 2013). Su estilo sedentario y las barreras biogeográficas identificadas en este documento le representan a las poblaciones de *A. moreletii* una limitante grande para establecer conectividad genética en las distintas localidades. La conectividad genética hace referencia a la capacidad de las poblaciones de una misma especie para mantener un flujo de genes entre ellas (Covarrubias, et al., 2021). Esta falta de conectividad entre las poblaciones en periodos prolongados de tiempo (millones de años) provoca que todos los alelos nuevos que surjan en las poblaciones individuales debido a mutaciones y otras presiones evolutivas no sean compartidos con otras poblaciones lo que incrementa las diferencias genéticas y fenotípicas. La expresión de estas diferencias puede verse representadas en caracteres morfológicos tanto como en expresiones fenotípicas que no pueden ser observadas.

Con respecto a los resultados que relacionan la variabilidad genética de las poblaciones muestreadas con la estructura poblacional designada, se puede observar en los cuadros 4 y 5 los valores resultantes de estadístico ϕ_{ST} al comparar las cinco diferentes ESUs establecidas. Con respecto al Cuadro 4 correspondiente al marcador CytB, se puede observar

que las unidades con mayor similitud fueron la unidad Chiapas con la unidad Atlántico con 0.5980 y la mayor diferencia se vio entre las unidades Chiapas (CHA) y Veracruz (VER) con 0.9666. Con respecto al marcador 16S (Cuadro 5), se obtuvieron relaciones similares, siendo las unidades con mayor diferenciación igual que para el marcador CytB (VER y CHA con un valor de 1.0000), sin embargo, existen relaciones entre unidades con menor diferenciación, como fue el caso de las unidades de mayor similitud siendo las unidades de Chiapas y Pacífico con 0.2611. Estudios previos han demostrado que valores mayores a 0.2 demuestran estructura poblacional significativa (Luo, et al., 2019; Merilä & Crnokrak, 2001). En el caso de los resultados para ambos marcadores genéticos, podemos observar valores mayores a 0.5, con la excepción de la relación entre las unidades Chiapas y Pacífico discutida anteriormente. Esto indica una clara diferenciación a nivel de variabilidad genética entre las unidades establecidas en las distintas regiones de la distribución de *A. moreletii*.

La de red de Haplotipos correspondiente al marcador Citocromo B (Figura 7) presentó la relación más clara entre ambos marcadores. Al observar la red se puede determinar una distribución de haplotipos similar a las unidades establecidas en el análisis filogenético. La red a su vez posiciona al haplotipo conformado por la unidad Chiapas como el haplotipo del cual se separan el resto de las unidades. Con relación a los otros haplotipos, podemos observar que todas las demás unidades tienen por lo menos tres mutaciones con relación al haplotipo dentro de la unidad Chiapas, con excepción del haplotipo que contiene muestras asignadas a la unidad Atlántico el cual presenta una sola mutación con el haplotipo Chiapas. La unidad Atlántico a su vez es la que presento una mayor cantidad de haplotipos lo que refiere a una gran diversidad en la unidad. Los haplotipos de la unidad Guerrero fueron los que presentaron una mayor cantidad de mutaciones con respecto al haplotipo central de Chiapas con 8 mutaciones. La cantidad de mutaciones entre los haplotipos es congruente con la relación de la variabilidad genética según la estructura poblacional expresada en los resultados del estadístico ϕ_{ST} , determinando una vez más la diferencia a nivel genético entre las cinco ESUs establecidas. Observando las dimensiones de los haplotipos, se determina que los haplotipos más antiguos se originan en las ESUs de Pacífico y Atlántico, demostrado por el tamaño del haplotipo el cual se relaciona con la cantidad de individuos que presentaron el

mismo lo que indica que el haplotipo estuvo presente antes de que se separaran las poblaciones.

B. Comparación con análisis morfométrico

Los resultados de los análisis morfométricos fueron elaborados con el fin de determinar si las separaciones observadas con el análisis filogenético están relacionadas con alguna de las medidas tomadas a los individuos. Con respecto a los resultados del modelo de regresión logística múltiple se puede observar en el Cuadro 6 que las medidas que obtuvieron los valores más significativos al explicar la relación de los grupos designados fueron: Distancia entre nostrilos (IND), Largo de húmero (LHU) y Largo del antebrazo (FOL) respectivamente. Sin embargo, dentro del análisis del modelo se tiene el valor de pseudo R^2 (14%) el cual indica que tanto del total de los resultados (diferencias poblacionales) es explicado por las variables (mediadas morfológicas). Por lo mismo, se deduce por el valor que estas diferencias relacionadas con las medidas y las agrupaciones solo determinan un 14%, lo cual es muy bajo para poder concluir con certeza la relación de las medidas. Esta relación se puede observar gráficamente en las figuras 10, 11 y 12. Para las tres medidas podemos observar una ligera variación en las medianas, sin embargo, todas las figuras de violín representativas de cada una de las poblaciones se traslapan entre sí, por lo que se determina que las diferencias observadas no son significativas.

Adicionalmente del análisis con medidas individuales, se analizó la influencia de todas las medidas para explicar las agrupaciones mostradas por los resultados filogenéticos. El dendrograma realizado por el método de distancias UPGMA (Figura 8) establece la relación en forma de árbol. Dentro del dendrograma se observan las muestras en un código de color que las identifica según la agrupación determinada con el análisis filogenético. Tomando esto en cuenta, podemos observar que la distribución de las muestras en la figura no sigue el patrón mostrado por los árboles filogenéticos, por lo que se evidencia la falta de relación entre las medidas y la división de las poblaciones. Por último, en la Figura 9, se puede observar el gráfico del análisis de Componentes Principales (PCA) el cual muestra la distribución de las muestras en un plano de dos dimensiones. Cada una de las agrupaciones de los análisis filogenéticos está representada por un círculo con el color respectivo del

código. Dentro de la figura se puede observar como todas las agrupaciones representadas por los círculos se encuentran en la misma posición y no hay una que muestre una separación clara. Con estos tres análisis morfométricos, se puede determinar que las medidas tomadas a los individuos de *A. moreletii* a lo largo de su distribución no explican las diferencias genéticas observadas en los análisis filogenéticos.

C. Consideraciones finales

Mediante los resultados de ambos análisis se observó una clara diferenciación en las relaciones filogenéticas de las poblaciones de *A. moreletii* a lo largo de su distribución, la cual tiene poca o nula coincidencia con los resultados obtenidos de medidas estándar para el análisis morfológico de anuros. En el momento de plantear la separación de una especie en varias, es ideal que esta diferenciación sea sustentada con evidencia genética, morfológica y biogeográfica. Sin embargo, este no siempre es el caso ya que las diferencias genéticas no implican por necesidad un cambio en la morfología. Dentro del genoma de todas las especies, hay secciones de este que se expresan en el individuo llamado expresión fenotípica y otras que cumplen otras funciones dentro de la maquinaria genética pero no necesariamente se expresan llamados expresión genotípica (Streelman & Kocher, 2000). La expresión fenotípica incluye un espectro amplio de características que se le asignan a un individuo, la más clara de todas son las expresiones que influyen en la morfología del individuo.

Sin embargo, las expresiones fenotípicas incluyen otras características como son las pautas de comportamiento como, por ejemplo, preferencias en fuentes de alimento, conductas relacionadas a la selección sexual, entre otros. Se debe a la presencia de las expresiones genotípicas y las expresiones fenotípicas no ligadas a características morfológicas que la separación de poblaciones en especies diferenciadas puede ser determinada a partir de diferencias genéticas y patrones biogeográficos a pesar de que estas diferencias no se vean reflejadas en la morfología de los individuos de las diferentes poblaciones. Este es el caso de las llamadas especies crípticas, las cuales son un grupo de especies que comparten una morfología, fisiología y comportamiento similar o idéntico, pero se encuentran aisladas en términos reproductivos. Estas especies se consideran como productos recientes del proceso de especiación, y se hipotetiza que, con el tiempo, de permanecer reproductivamente aisladas

esta diferenciación se verá representada de igual manera en aspectos morfológicos o fisiológicos (Bickford, et al., 2007).

La separación de las poblaciones identificadas siendo estas las unidades de significancia evolutiva: Pacífico (sur de Chiapas, vertiente pacífica de Guatemala y El Salvador), Chiapas (centro del estado), Guerrero, Veracruz y Atlántico (norte de Chiapas, vertiente atlántica de Guatemala, Belice y Honduras), tendría relevancia en el momento de determinar el estado población y categorizar a los diferentes grupos en sus estados de conservación. Actualmente *Agalychnis moreletii* se categoriza como de preocupación menor en la lista roja de la UICN (UICN, 2017) debida a su amplia distribución. Sin embargo, hay un continuo declive en las poblaciones. En la actualidad las amenazas principales para la especie están muy relacionadas con la expansión de la frontera agrícola y urbana provocando la pérdida de sus hábitats idóneos y la perturbación de los cuerpos de agua no solo en la contaminación del agua sino de igual forma en la introducción de especies invasoras como *Rhinella horribilis*. Esta pérdida de hábitat es una amenaza generalizada en todas las regiones donde habita *A. moreletii*, sin embargo, el ritmo en el que se pierden los bosques donde estas poblaciones habitan ocurren a diferentes tasas; ya que existen diferencias en el manejo de áreas naturales y la disposición política para conservarlas en cada uno de los cinco territorios políticos en los cuales se distribuyen. La separación de *A. moreletii* en diferentes especies o grupos de manejo contribuiría en una evaluación más precisa de la salud poblacional de cada uno de las especies o grupos y, por ende, resaltaría la necesidad de cada una en términos de los planes de conservación que requieren para poder mantenerlas como poblaciones viables.

5. CONCLUSIONES

- Según los resultados obtenidos a partir de la elaboración de árboles filogenéticos bajo diversos métodos de reconstrucción se obtuvieron cuatro unidades de significancia evolutiva.
- La unidad o grupo Pacífico, grupo Chiapas, unidad de Guerrero y grupo Veracruz.
- Las divisiones de las unidades significativas evolutivas generadas a partir de los análisis filogenéticos son respaldadas bajo evidencia biogeográfica separando a las unidades por barreras altitudinales; evidenciando la pérdida de flujo genético entre ellas y por ende fomentando la diferenciación de los grupos.
- Una unidad extra fue propuesta, siendo la unidad Atlántico con poblaciones del norte de Chiapas, norte de la meseta central de Guatemala, Belice y Honduras. Esta unidad no presento una topología clara y obtuvo soportes bajos en los árboles, sin embargo, mostro estar diferenciada del resto según los análisis relacionados con variación genética.
- Los análisis morfométricos no presentaron ninguna evidencia que separare a la especie en los diferentes grupos de manejo.

6. RECOMENDACIONES

Conforme a los resultados presentados, se logro identificar exitosamente cuatro unidades de significancia evolutiva nombradas Pacífico, Chiapas, Veracruz y Guerrero. A pesar de que estas cuatro agrupaciones presentan una diferenciación suficiente como para ser consideradas especies diferentes, es necesario resolver la relación de las poblaciones restantes de *Agalychnis moreletii*. Las poblaciones que presentaron una relación inconclusa dentro de los árboles construidos fueron asignados a un grupo de manejo extra nombrado Atlántico, debido a la relación geográfica de estas poblaciones restantes. Para poder mejor el análisis es necesario incluir más muestras de otras poblaciones dentro del rango de distribución de la actual *A. moreletii* para aumentar el tamaño de muestreo. Estas nuevas muestras podrían provenir tanto de la región correspondiente a la unidad Atlántico como de otras regiones ajenas a esta unidad ya que ambas posibilidades beneficiarían en la certeza de los métodos para reconstruir la filogenia de todas las poblaciones.

Aparte de las poblaciones de las cuales fueron obtenidas las muestras para la presente investigación, existen poblaciones dentro otro territorio muestreado que se hipotetiza que podría ser una unidad de manejo diferenciada o por lo menos, poblaciones pertenecientes a una de las unidades ya establecidas. Esta potencial unidad estaría conformada por las poblaciones de *A. moreletii* pertenecientes al territorio de Oaxaca, México. Esta localidad se encuentra separada de las unidades Guerrero y Veracruz por una serie de barrera biogeográficas generadas a partir del istmo de Tehuantepec. Esta posible agrupación sería de gran importancia para determinar la relación de todas las poblaciones de la actual especie *A. moreletii*, poder establecer concretamente si la misma debería ser desintegrada y potencialmente ser separada en 6 especies nuevas.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adler, K., Bauer, A. M., Moriarty, J. J., & Price, A. H. (2008). *Society for the Study of Amphibians and Reptiles*. Herpetological Review, 39(2).
- Allendorf, F. W., Hohenlohe, P. A., & Luikart, G. (2010). *Genomics and the future of conservation genetics*. Nature reviews genetics, 11(10), 697-709.
- Amphibian ark. (2017). *Boletín Informativo No. 38*. Conservation Breeding Specialist Group. 12101 Johnny Cake Ridge Road. Minnesota, USA.
- AmphibiaWeb. (2022). *AmphibiaWeb*. University of California. <<https://amphibiaweb.org>>
- Barry, J., & Eckersley, R. (Eds.). (2005). *The state and the global ecological crisis*. MIT Press.
- Bengtsson, T., Manninen, O., Jahoor, A., & Orabi, J. (2017). *Genetic diversity, population structure and linkage disequilibrium in Nordic spring barley (*Hordeum vulgare* L. subsp. *vulgare*)*. Genetic Resources and Crop Evolution, 64(8), 2021-2033.
- Bishop, P. J., Angulo, A., Lewis, J. P., Moore, R. D., Rabb, G. B., & Moreno, J. G. (2012). *The Amphibian Extinction Crisis-what will it take to put the action into the Amphibian Conservation Action Plan?*. SAPI EN. S. Surveys and Perspectives Integrating Environment and Society, (5.2).
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K., Meier, R., Winker, K., ... & Das, I. (2007). *Cryptic species as a window on diversity and conservation*. Trends in ecology & evolution, 22(3), 148-155.
- Caviedes-Solis, I.W., Vazquez-Vega, L.F., Solano-Zavaleta, I., Perez-Ramos, E., Rovito, S.M., Devitt, T.J., Heimes, P., Flores-Villela, O.A., Campbell, J.A. and Montes de Oca, A.N. (2015). *Everything is not lost: recent records, rediscoveries, and range extensions of Mexican hylid frogs*. Mesoamerican Herpetology 2(3): 230-241.
- Clark, M. (2019). *Evolution of color diversity in red-eyed treefrogs (*Agalychnis callidryas*)*. Doctoral dissertation, California State University, Northridge.

- CONAP. (2021). *Lista de especies amenazadas de Guatemala -LEA-*. Guatemala, Guatemala.
- Covarrubias, S., González, C., & Gutiérrez-Rodríguez, C. (2021). *Effects of natural and anthropogenic features on functional connectivity of anurans: a review of landscape genetics studies in temperate, subtropical and tropical species*. *Journal of Zoology*, 313(3), 159-171.
- Cutter, A. (2019). *A primer of molecular population genetics*. Oxford University Press.
- Duellman, W. E. (1970). *The hylid frogs of Middle America*.
- Ellegren, H., & Galtier, N. (2016). *Determinants of genetic diversity*. *Nature Reviews Genetics*, 17(7), 422-433.
- Faivovich, J., Haddad, C. F., Garcia, P. C., 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*. *Bulletin of the American Museum of natural History*, 2005(294), 1-240.
- Fazekas, A. J. et al. (2012). DNA Barcodes. doi: 10.1007/978-1-61779-591-6.
- Frankham, R. (2003). *Genetics and conservation biology*. *Comptes Rendus Biologies*, 326, 22-29.
- Frankham, R. (2005). *Stress and adaptation in conservation genetics*. *Journal of evolutionary biology*, 18(4), 750-755.
- Freeland, J. R. (2020). *Molecular ecology*. John Wiley & Sons.
- Frias-Alvarez, P., Vredenburg, V.T., Familiar-Lopez, M., Longcore, L.E., Gonzalez-Bernal, E., Santos-Barrera, G., Zambrano, L. and Parra-Olea, G. 2008. *Chytridiomycosis Survey in Wild and Captive Mexican Amphibians*. *EcoHealth* 5(1): 18-26.
- Funk, W. C., Caminer, M., & Ron, S. R. (2012). *High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1734), 1806-1814.
- Gillespie, G. R., Scroggie, M. P., Roberts, J. D., Cogger, H. G., Mahony, M. J., & McDonald, K. R. (2011). *The influence of uncertainty on conservation assessments: Australian frogs as a case study*. *Biological Conservation*, 144(5), 1516-1525.

- Grandcolas, P., Deleporte, P., Desutter-Grandcolas, L., & Daugeron, C. (2001). *Phylogenetics and Ecology: As Many Characters as Possible Should Be Included in the Cladistic Analysis 1*. *Cladistics*, 17(1), 104-110.
- Hamilton, M. B. (2021). *Population genetics*. John Wiley & Sons.
- IUCN SSC Amphibian Specialist Group. (2017). *Agalychnis moreletii*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T55293A53951672. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T55293A53951672.en>. Accessed on 29 August 2022.
- Kohler, G. (2013). *Amphibians of Central America*.
- KUBICKI, B. (2005). *Comments on the distribution and conservation of Morelet's Leaf Frog, Agalychnis moreletii (Amphibia: Hylidae), in Oaxaca, Mexico*. *Science*, 7, 628-638.
- Lee, J. C. (1982). *Accuracy and precision in anuran morphometrics: artifacts of preservation*. *Systematic Biology*, 31(3), 266-281.
- Loeschcke, V., Tomiuk, J., & Jain, S. K. (Eds.). (2013). *Conservation genetics* (Vol. 68). Birkhäuser.
- Luo, Z., Brock, J., Dyer, J. M., Kutchan, T., Schachtman, D., Augustin, M., ... & Abdel-Haleem, H. (2019). *Genetic diversity and population structure of a Camelina sativa spring panel*. *Frontiers in Plant Science*, 10, 184.
- Merilä, J., & Crnokrak, P. (2001). *Comparison of genetic differentiation at marker loci and quantitative traits*. *Journal of Evolutionary Biology*, 14(6), 892-903.
- Moritz, C. (1992). *Defining ESUs for conservation*. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 9(Elsevier Science Ltd 100th issue essays), 373–375. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(94\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0169-5347(94)90057-4)
- Ouborg, N. J., Pertoldi, C., Loeschcke, V., Bijlsma, R. K., & Hedrick, P. W. (2010). *Conservation genetics in transition to conservation genomics*. *Trends in genetics*, 26(4), 177-187.
- Palumbi, S. R.; Martin, A. P.; Romano, S.; Mcmilan, W. O.; Stice, L. and Grabowski, G. (1991). *The simple fool's guide to PCR*. University of Hawaii.

- R Core Team (2012). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>
- Savage, J. M. (1982). *The enigma of the Central American herpetofauna: dispersals or vicariance?*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 69(3), 464-547.
- Schierwater, B., Streit, B., Wagner, G. P., & DeSalle, R. (Eds.). (2013). *Molecular ecology and evolution: approaches and applications* (Vol. 69). Birkhäuser.
- Schmid, M., Bogart, J. P., & Hedges, S. B. (2018). *The Arboranan Frogs*. *Cytogenet Genome Res*, 155, 1-326.
- Sisk, T. D., Launer, A. E., Switky, K. R., & Ehrlich, P. R. (1994). *Identifying extinction threats: global analyses of the distribution of biodiversity and the expansion of the human enterprise*. In *Ecosystem management* (pp. 53-68). Springer, New York, NY.
- Šlenker, M., Koutecký, P., Marhold, K. (2022). “*MorphoTools2: an R package for multivariate morphometric analysis*.” *Bioinformatics*, 38(10), 2954-2955. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac173>.
- Streelman, J. T., & Kocher, T. D. (2000). *From phenotype to genotype*. *Evolution & development*, 2(3), 166-173.
- Sunnucks, P. (2000). *Efficient genetic markers for population biology*. *Trends in ecology & evolution*, 15(5), 199-203.
- Tolosa, Y., Molina-Zuluaga, C., Restrepo, A., & Daza, J. M. (2015). *Sexual maturity and sexual dimorphism in a population of the rocket-frog *Colostethus aff. fraterdanieli* (Anura: Dendrobatidae) on the northeastern Cordillera Central of Colombia*. *Actualidades Biológicas*, 37(102), 287-294.
- Valentini, A., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2009). *DNA barcoding for ecologists*. *Trends in ecology & evolution*, 24(2), 110-117.
- Watters, J. L., Cummings, S. T., Flanagan, R. L., & Siler, C. D. (2016). *Review of morphometric measurements used in anuran species descriptions and recommendations for a standardized approach*. *Zootaxa*, 4072(4), 477-495.
- Wickham H (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org>.

- Wiens, J. J. (2007). *Global patterns of diversification and species richness in amphibians*. *the american naturalist*, 170(S2), S86-S106.
- Witzemberger, K. A., & Hochkirch, A. (2011). *Ex situ conservation genetics: a review of molecular studies on the genetic consequences of captive breeding programmes for endangered animal species*. *Biodiversity and conservation*, 20(9), 1843-1861.

XII. ANEXOS

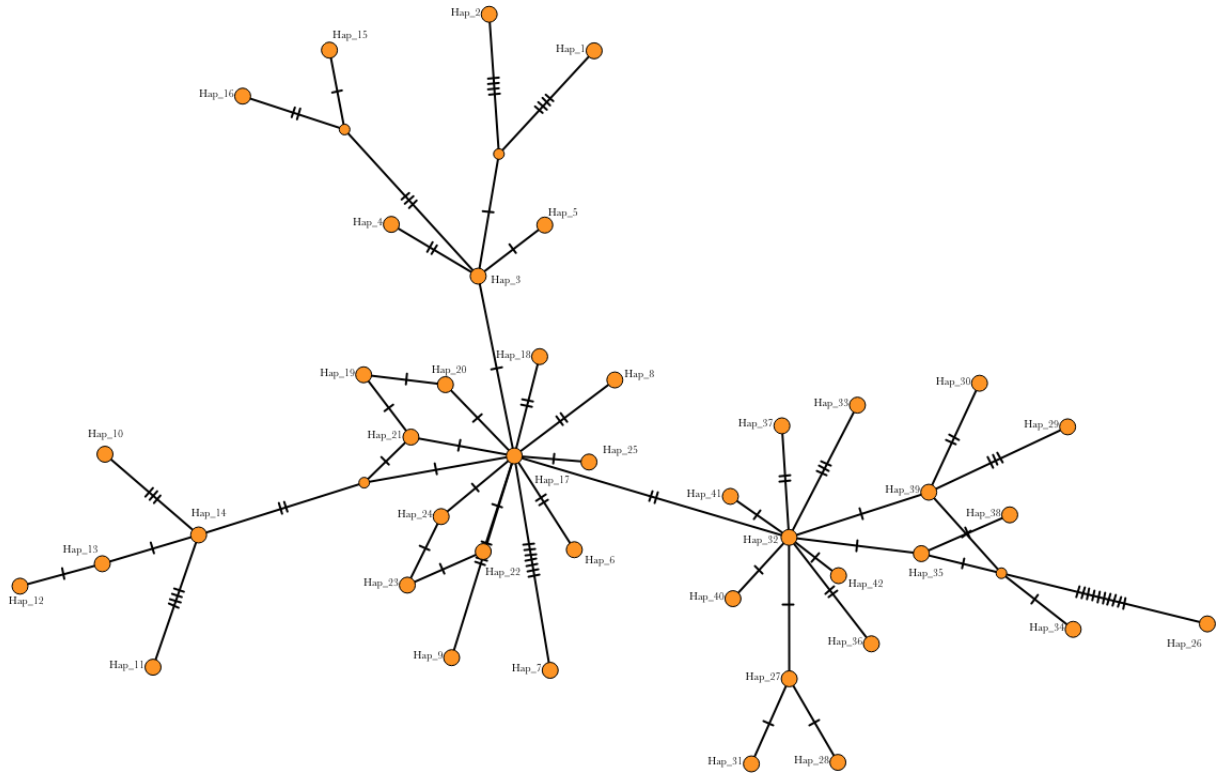


Figura 13. Rede de haplotipos elaborada a partir de las 154 secuencias para el marcador molecular 16S agrupadas según las unidades de significancia evolutiva (ESU) establecidas.

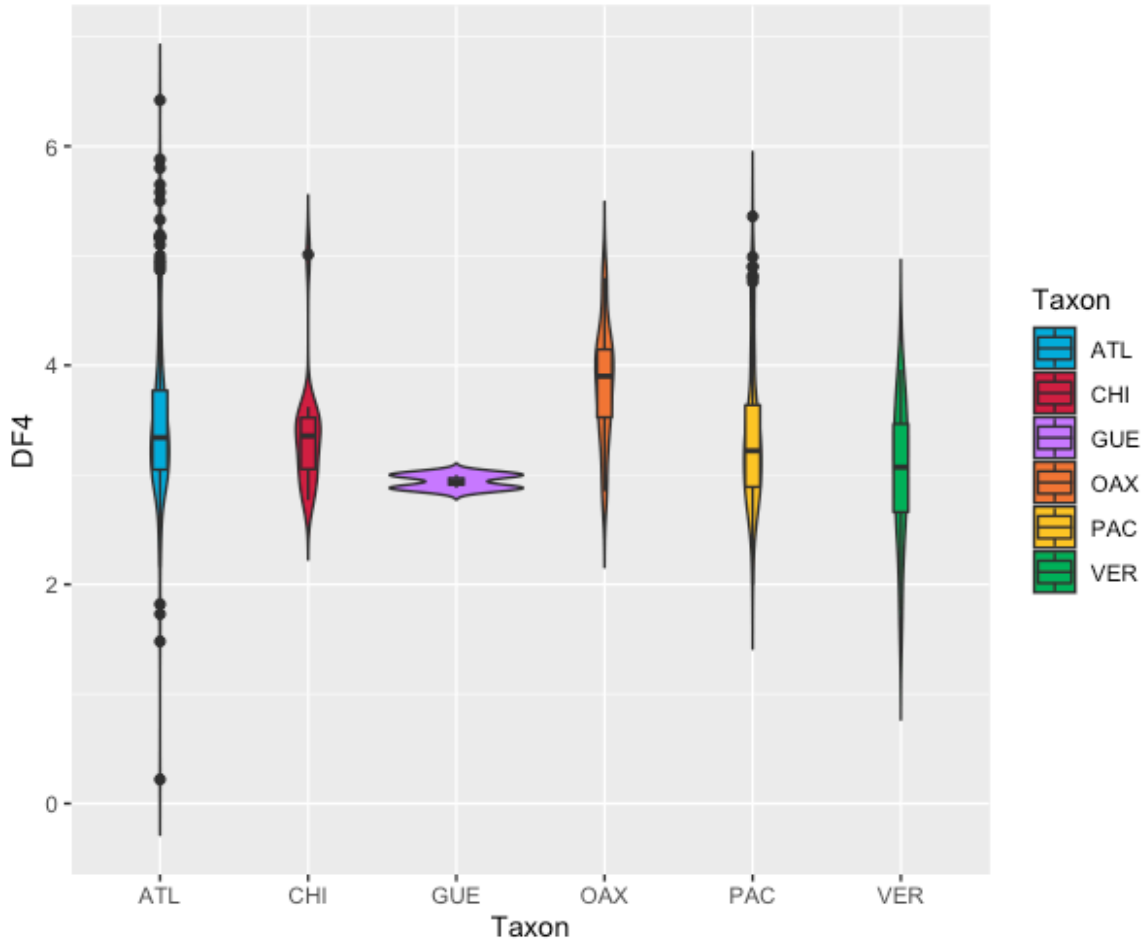


Figura 14. Gráfico de violín para la medida Diámetro del disco del dedo 4 de las patas traseras (DF4) en los individuos de *A. moreletii* en las 6 poblaciones asignadas (Atlántico, Pacífico, Veracruz, Guerrero, Oaxaca y Chiapas).

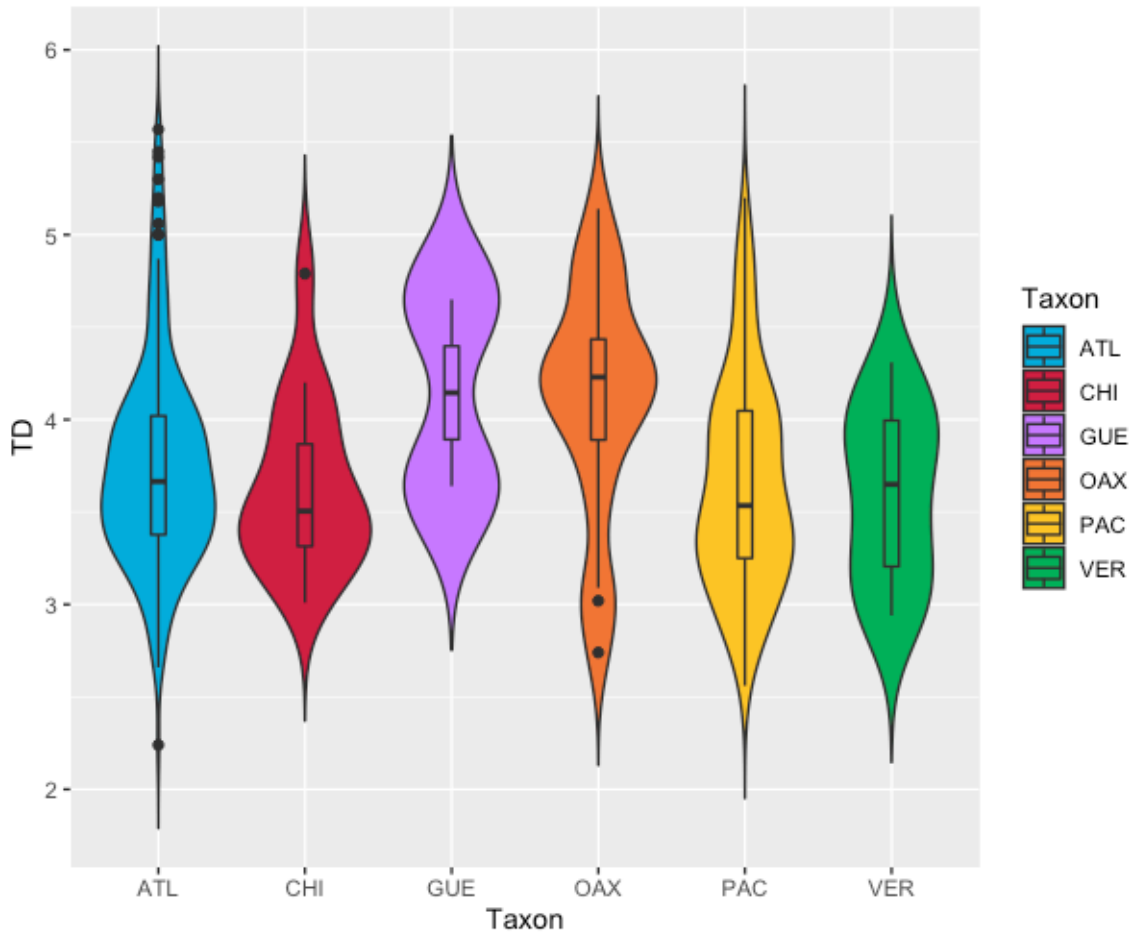


Figura 15. Gráfico de violín para la medida Diámetro del Tímpano (TD) en los individuos de *A. moreletii* en las 6 poblaciones asignadas (Atlántico, Pacífico, Veracruz, Guerrero, Oaxaca y Chiapas).

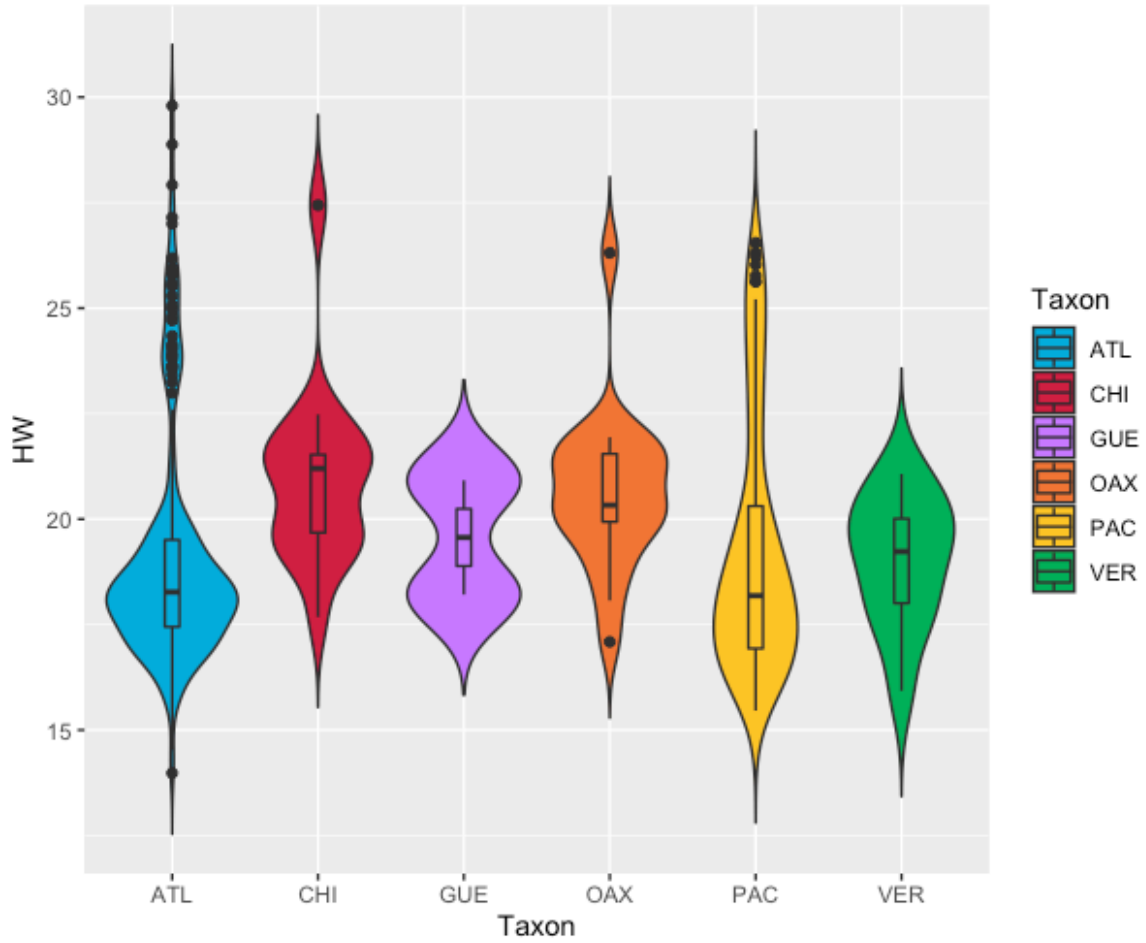


Figura 16. Gráfico de violín para la medida Ancho de la cabeza (HW) en los individuos de *A. moreletii* en las 6 poblaciones asignadas (Atlántico, Pacífico, Veracruz, Guerrero, Oaxaca y Chiapas).

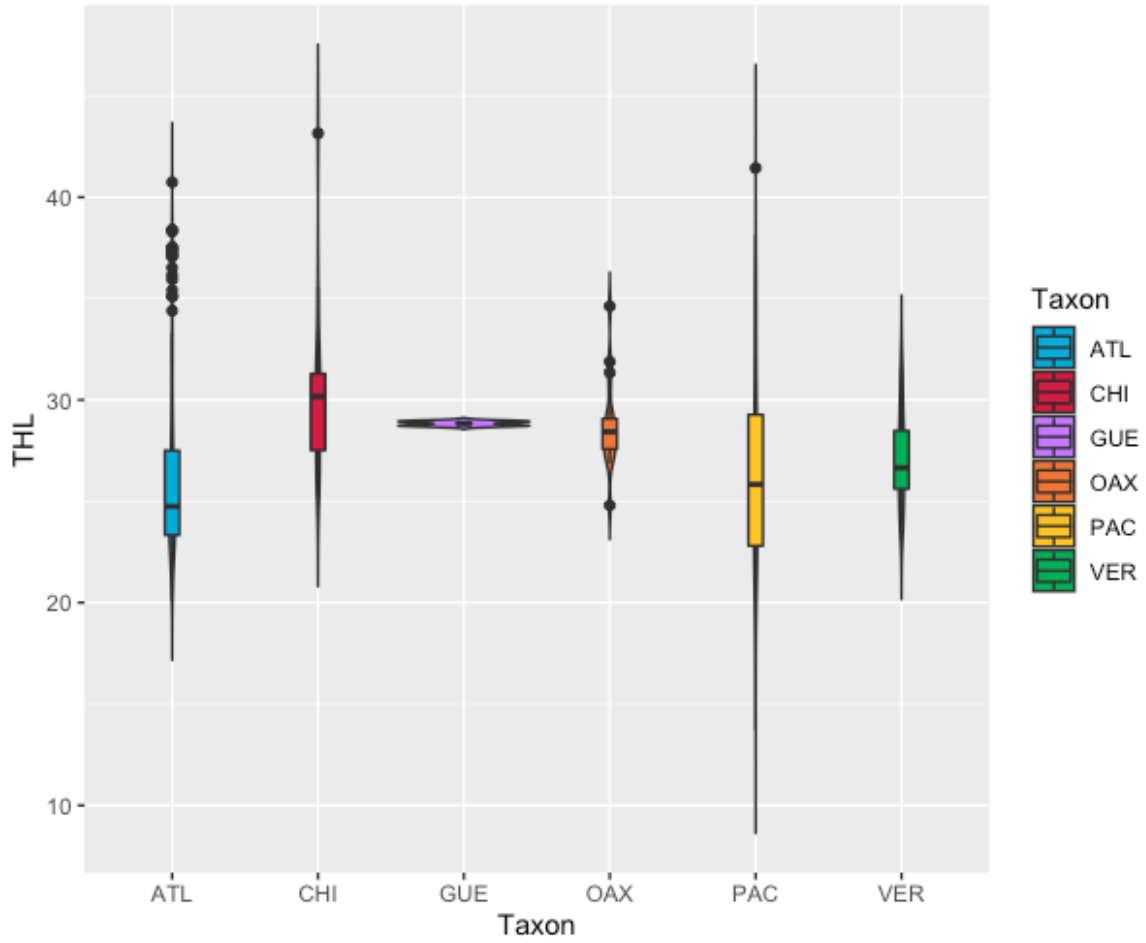


Figura 17. Gráfico de violín para la medida Largo del muslo (THL) en los individuos de *A. moreletii* en las 6 poblaciones asignadas (Atlántico, Pacífico, Veracruz, Guerrero, Oaxaca y Chiapas).

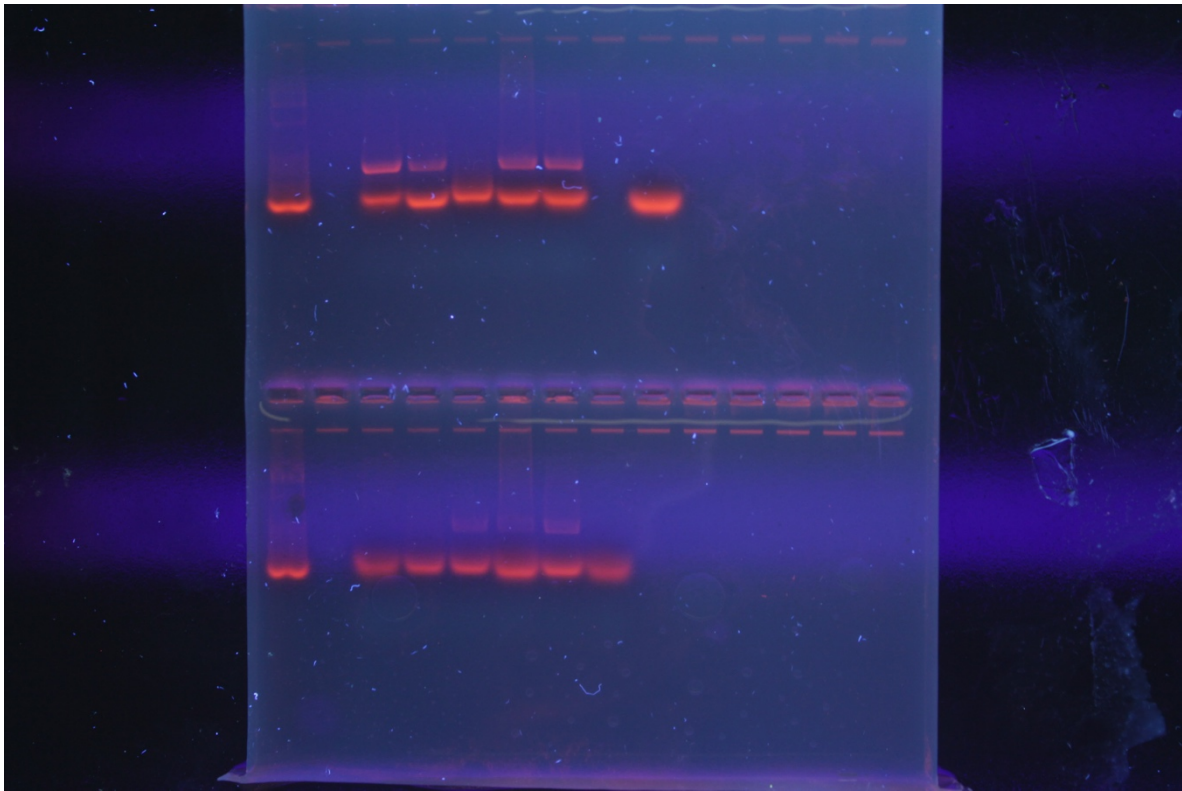


Figura 18. Gel de agarosa al 1%, producto de PCR utilizando los marcadores mitocondriales 16S y Citocromo B.