

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Diversidad genética poblacional de Hylidae en Centroamérica, los casos de la rana de ojos negros (Hylidae: *Agalychnis moreletii* Duméril, 1853), la rana verde de ojos rojos (Hylidae: *Agalychnis callidryas* Cope, 1862) y la rana de arroyo de Copán (Hylidae: *Ptychohyla hypomykter* McCranie & Wilson, 1993)

Trabajo de graduación presentado  
por Lizbeth Karina Coxaj Alvarez  
para optar al grado académico de Licenciada en Biología

Guatemala

2020



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Diversidad genética poblacional de Hylidae en Centroamérica, los casos de la rana de ojos negros (Hylidae: *Agalychnis moreletii* Duméril, 1853), la rana verde de ojos rojos (Hylidae: *Agalychnis callidryas* Cope, 1862) y la rana de arroyo de Copán (Hylidae: *Ptychohyla hypomykter* McCranie & Wilson, 1993)

Trabajo de graduación presentado  
por Lizbeth Karina Coxaj Alvarez  
para optar al grado académico de Licenciada en Biología

Guatemala

2020

Vo. Bo. Asesor Principal



---

PhD. Olga Alejandra Zamora Jérez

Tribunal examinador



---

PhD. Olga Alejandra Zamora Jérez



---

M.Sc. Daniel Ariano Sánchez



---

M.Sc. Luis Estuardo Ríos González

Fecha de aprobación: 22 de octubre de 2020

## PREFACIO

Al inicio de mi carrera, a lo largo de la misma, y a futuro debo agradecer principalmente a mis padres. Quienes confiaron en mí y respetaron mi decisión para poder seguir la carrera de Licenciatura en Biología. A mi hermana, quien siempre estaba y estará para mí apoyándome en todo momento.

A su vez, a lo largo de mi formación como bióloga debo agradecer a mis catedráticos. Los cuales me brindaron mucho apoyo profesional para mi crecimiento individual y académico. Especialmente a la Licenciada Elena Dardón y M. Sc. Daniel Ariano, quienes, gracias a sus clases y su amor por su trabajo, me transmitieron lo que hoy me apasiona: la genética en la conservación de especies. También a M. Sc. Patricia Herrera, quien durante mis prácticas profesionales me ayudo, enseñó y resolvía mis dudas sobre la genética. Ayudándome a conocer y a amar más sobre esta ciencia.

Además, debo agradecer a aquellas personas que estuvieron involucradas en este estudio. Primeramente, a don Paulino y Sofia Aguilar de la Finca Patrocinio; y al Licenciado Marcelo Serrano, en Finca Sac Wach Já, por permitirme tomar muestras. Y aunque fue un estudio en el que ya no se pudo realizar el análisis de muestras debido a la pandemia por COVID-19. Aun así, debo agradecerles por abrirme las puertas para realizar investigación. También debo agradecer nuevamente a M. Sc. Daniel Ariano, M. Sc. Luis Ríos y M. Sc. Gabriela Alfaro, por acompañarme en mi proceso de elaboración de tesis. Sin su apoyo, disposición, experiencia y sus amplios conocimientos no podría lograrlo.

Por último, debo agradecer inmensamente a PhD. Alejandra Zamora, mi asesora principal en mi trabajo de graduación. Quien, a pesar de conocerla por poco tiempo, me enseñó su pasión y conocimientos. Además de apoyarme en estructurar nuevamente mi tesis frente a la pandemia; y de cederme parte de sus datos recolectados y trabajados para conformar mi tesis. Me acompañó en todo momento, a altas horas de la noche, en sus días de descanso, motivándome, respondiendo a las preguntas repetitivas, confusas y en todo aquello por lo que atraviesa un tesista. Sinceramente no puedo expresar en palabras todo el agradecimiento y admiración hacia ella. Sin más, muchas gracias a todos aquellos que estuvieron alrededor mío, familiares, catedráticos, compañeros, amigos.

## CONTENIDO

PREFACIO	V
LISTA DE CUADROS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE APÉNDICES	X
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	2
III. JUSTIFICACIÓN	3
IV. MARCO TEÓRICO	4
A. Concepto de diversidad biológica	4
B. Medidas de diversidad genética	4
C. Biología molecular en la conservación de especies	5
D. El genoma mitocondrial	6
E. Estrategias de conservación de recursos genéticos	6
F. Generalidades de Anura	7
G. Anfibios y servicios ecosistémicos	8
H. Amenazas para las poblaciones de anfibios	9
I. <i>Agalychnis moreletii</i>	10
J. <i>Agalychnis callidryas</i>	10
K. <i>Ptychohyla hypomykter</i>	11
V. METODOLOGÍA	13
A. Áreas de estudio	14
1. <i>Agalychnis moreletii</i>	14
2. <i>Agalychnis callidryas</i>	18
3. <i>Ptychohyla hypomykter</i>	20
B. Procedimientos	22
1. Obtención de las secuencias de <i>A. moreletii</i>	22
2. Obtención de las secuencias de <i>A. callidryas</i> y <i>P. hypomykter</i>	23
3. Análisis de datos	23

VI. RESULTADOS	25
A. <i>Agalychnis moreletii</i>	25
B. <i>Agalychnis callidryas</i>	35
C. <i>Ptychohyla hypomykter</i>	40
VII. DISCUSIÓN	45
A. Genética poblacional de <i>A. moreletii</i>	45
1. Indicadores de variabilidad genética	45
2. Estructura genética poblacional	46
3. Historia demográfica poblacional	48
4. Análisis de filogenia	49
5. Modelos de evolución	50
B. Genética poblacional de <i>A. callidryas</i>	51
1. Indicadores de variabilidad genética	51
2. Estructura genética poblacional	52
3. Historia demográfica poblacional	53
4. Análisis de filogenia	54
5. Modelos de evolución	54
C. Genética poblacional de <i>P. hypomykter</i>	54
1. Indicadores de variabilidad genética	54
2. Estructura genética poblacional	55
3. Historia demográfica poblacional	55
4. Análisis de filogenia	56
5. Modelos de evolución	56
D. Recomendaciones para la conservación de Hylidae en Centroamérica	56
VIII. CONCLUSIONES	59
IX. RECOMENDACIONES	61
X. LITERATURA CITADA	62
XI. APÉNDICE	72

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Poblaciones de las especies de Hylidae estudiadas en la región Centroamericana..	13
<b>Cuadro 2.</b> Marcadores seleccionados para amplificar la región mitocondrial Citocromo b y 16S.	22
<b>Cuadro 3.</b> Análisis genético de poblaciones de Guatemala y El Salvador, a partir de secuencias del gen 16S en <i>A. moreletii</i> utilizando el software DnaSP.	25
<b>Cuadro 4.</b> Análisis genético de, a partir de secuencias del gen <i>cyt b</i> en <i>A. moreletii</i> utilizando el software DnaSP.	26
<b>Cuadro 5.</b> Índice de diferenciación genética (FST), a partir de secuencias del gen 16S en <i>A. moreletii</i> utilizando el software DnaSP.	27
<b>Cuadro 6.</b> Índice de diferenciación genética (FST), a partir de secuencias del gen <i>Cyt b</i> en <i>A. moreletii</i> utilizando el software DnaSP.	27
<b>Cuadro 7.</b> Test de neutralidad D de Tajima, a partir de secuencias del gen 16S en <i>A. moreletii</i> utilizando el software DnaSP.	29
<b>Cuadro 8.</b> Test de neutralidad D de Tajima, a partir de secuencias del gen <i>cytb</i> en <i>A. moreletii</i> utilizando el software DnaSP.	29
<b>Cuadro 9.</b> Análisis genético de poblaciones, a partir de secuencias del gen 16S en <i>A. callidryas</i> utilizando el software DnaSP.	35
<b>Cuadro 10.</b> Índice de diferenciación genética (FST), a partir de secuencias del gen 16S en <i>A. callidryas</i> utilizando el software DnaSP.	36
<b>Cuadro 11.</b> Test de neutralidad D de Tajima, a partir de secuencias del gen 16S en <i>A. callidryas</i> utilizando el software DnaSP.	37
<b>Cuadro 12.</b> Análisis genético de poblaciones, a partir de secuencias del gen 16S en <i>P. hypomykter</i> utilizando el software DnaSP.	40
<b>Cuadro 13.</b> Índice de diferenciación genética (FST), a partir de secuencias del gen 16S en <i>P. hypomykter</i> utilizando el software DnaSP.	41
<b>Cuadro 14.</b> Test de neutralidad D de Tajima, a partir de secuencias del gen 16S en <i>P. hypomykter</i> utilizando el software DnaSP.	42

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida Anura.	7
<b>Figura 2.</b> Anatomía de Anura.	8
<b>Figura 3.</b> Mapa de distribución de <i>A. moreletii</i> .	10
<b>Figura 4.</b> Mapa de distribución de <i>A. callidryas</i> .	11
<b>Figura 5.</b> Mapa de distribución de <i>P. hypomykter</i> .	12
<b>Figura 6.</b> Distribución geográfica de las poblaciones de las ranas de ojos negros (Hylidae: <i>A. moreletii</i> Duméril, 1853) en Guatemala y El Salvador.	17
<b>Figura 7.</b> Distribución geográfica de las poblaciones de las ranas de ojos rojos (Hylidae: <i>A. callidryas</i> Cope, 1862) en Costa Rica y Panamá.	19
<b>Figura 8.</b> Distribución geográfica de las poblaciones de las ranas de ojos rojos (Hylidae: <i>P. hypomykter</i> McCranie & Wilson, 1993) en Honduras y Nicaragua.	21
<b>Figura 9.</b> Filogenia de las relaciones de <i>A. moreletii</i> entre las poblaciones, utilizando alineamientos concatenados de los genes de Cyt b y 16S.	30
<b>Figura 10.</b> Red de haplotipos obtenida a partir de las 55 secuencias de <i>A. moreletii</i> del gen 16S en el software Popart.	31
<b>Figura 11.</b> Red de haplotipos obtenida a partir de las 60 secuencias de <i>A. moreletii</i> del gen Cyt b en el software Popart.	32
<b>Figura 12.</b> Frecuencias y distribución de haplotipos de <i>A. moreletii</i> del gen 16S obtenida de 9 poblaciones.	33
<b>Figura 13.</b> Frecuencias y distribución de haplotipos de <i>A. moreletii</i> del gen Cyt b obtenida de 9 poblaciones.	34
<b>Figura 14.</b> Filogenia de las relaciones de <i>Agalychnis callidryas</i> entre las poblaciones, utilizando el gen 16S.	38
<b>Figura 15.</b> Red de haplotipos obtenida a partir de las 76 secuencias de <i>A. callidryas</i> del gen 16S en el software Popart.	39
<b>Figura 16.</b> Filogenia de las relaciones de <i>Ptychohyala hypomykter</i> entre las poblaciones, utilizando el gen 16S.	43
<b>Figura 17.</b> Red de haplotipos obtenida a partir de las 55 secuencias de <i>P. hypomykter</i> del gen 16S en el software Popart.	44

## LISTA DE APÉNDICES

<b>Apéndice 1.</b> Cantidad de secuencias utilizadas de zonas de Guatemala y El Salvador para el análisis de <i>Agalychnis moreletii</i> de los genes mitocondriales 16S y Cyt b.	72
<b>Apéndice 2.</b> Cantidad de secuencias utilizadas de zonas de Costa Rica y Panamá para el análisis de <i>Agalychnis callidryas</i> del gen mitocondrial 16S.	73
<b>Apéndice 3.</b> Cantidad de secuencias utilizadas de zonas de Honduras y Nicaragua para el análisis de <i>Ptychohyla hypomykter</i> del gen mitocondrial 16S.	73
<b>Apéndice 4.</b> Licencia de investigación y colecta gestionada en el Consejo de Áreas Protegidas (CONAP) para <i>A. moreletii</i> en Guatemala.	74
<b>Apéndice 5.</b> Renovación licencia de colecta gestionada en el Consejo de Áreas Protegidas (CONAP) para <i>A. moreletii</i> en Guatemala.	75
<b>Apéndice 6.</b> Autorización de investigación y recolecta científica en áreas naturales protegidas gestionada en el Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales en El Salvador, para <i>A. moreletii</i> .	76

## RESUMEN

La diversidad biológica comprende al conjunto de ecosistemas, especies y diversidad genética; siendo la diversidad genética una rama muy poco estudiada. Es importante estudiarla debido a que es determinante en su capacidad de adaptación a las variaciones del ambiente e incluso a los efectos de la perturbación humana. En este trabajo se evalúa la diversidad genética poblacional de *Agalychnis moreletii*, *Agalychnis callidryas* y *Ptychohyla hypomykter*. Especies pertenecientes a la familia Hylidae, listados como especies de preocupación menor y vulnerable debido a la resistencia que presenta a la alteración y degradación de su hábitat. Sin embargo, los estudios elaborados para estas especies no se tomaron en cuenta la genética de poblaciones, por lo que no se conoce el estado real de la población.

Para ello el objetivo principal de este estudio es determinar la diversidad genética poblacional de tres especies de Hylidae en Centroamérica. Para ello se implementó el a través del ADN mitocondrial, en base a los genes 16S y Cyt *b*. Obteniendo secuencias 55 secuencias del gen 16S y 60 de Cyt *b* de *A. moreletii* por PhD. Alejandra Zamora, de Guatemala y El Salvador. Por otro lado, para *A. callidryas* y *P. hypomykter* se obtuvieron secuencias del NCBI de la región 16S, siendo 76 y 55 secuencias, respectivamente. De esta forma se implementaron análisis para determinar el modelo de substitución que mejor se adapta a los datos, la presencia de polimorfismos, el índice de diferenciación genética, el test de neutralidad (D de Tajima), la presencia de haplotipos y análisis filogenéticos.

Por tanto, los resultados para este estudio sugieren que las poblaciones de *A. moreletii* en el gen 16S y Cyt *b*, y para *P. hypomykter* en el gen 16S poseen una baja diversidad de ADN. En cambio, en *A. callidryas* presenta altos polimorfismos que sugiere, en un futuro, se genere especiación alopátrica. Eventos como las barreras geográficas podrían ser la causa de estos resultandos. Sin embargo, la incidencia humana puede que haya provocado que se experimente perdida de flujo genético y por ende baja diversidad. Por lo que los esfuerzos para la conservación se centrarían en mejorar la conectividad entre poblaciones y disminuir los riesgos que presenta la época seca.

## ABSTRACT

Biological diversity includes ecosystems, species and genetic diversity; being genetic diversity a branch very little studied. It's important to study, because is decisive in the ability to adapt to environmental variations and even to the effects of human disturbance. In this work, the population genetic diversity of *Agalychnis moreletii*, *Agalychnis callidryas* and *Ptychohyla hypomykter* is evaluated. Species belonging to the Hylidae family, listed as species of least concern and vulnerable, since their resistance to the alteration and degradation of their habitat is good. However, the studies carried out for these species did not take into account population genetics, so the current status is unknown.

For this reason, the main objective of this study is, determine the population genetic diversity of three Hyliade species in Central America. For this, the mitochondrial DNA was incorporate for the study, based on the 16S and Cyt *b* genes. Obtaining sequences 55 sequences of the 16S gene and 60 of Cyt *b* of *A. moreletii* by PhD. Alejandra Zamora, from Guatemala and El Salvador. On the other hand, for *A. callidryas* and *P. hypomykter* sequences were obtained from the NCBI of the 16S region, being 76 and 55 sequences, respectively. In this way, analyzes were implemented to determine the substitution model that best adapted to the data, the presence of polymorphisms, the genetic differentiation index, the neutrality test (Tajima's *D*), the presence of haplotypes and phylogenetic analyzes.

Therefore, the results for this study suggest that the populations of *A. moreletii* in the 16S and Cyt *b* gene, and for *P. hypomykter* in the 16S gene have low DNA diversity. On the other hand, in *A. callidryas* presents high polymorphisms that suggest that in the future, allopatric speciation is generated. Events such as geographic barriers could be the cause of these. However, human incidence may have led to a loss of gene flow and therefore low diversity. Therefore, conservation efforts would focus on improving connectivity between populations and reducing the risks posed by the dry season.

# I. INTRODUCCIÓN

Los anfibios son uno de los grupos más diversos a nivel mundial, pero también uno de los más amenazados. Más de un tercio de los anfibios está en peligro de extinción (Heying, 2003; Miller y Fowler, 2015; IUCN, 2020).

La diversidad de anfibios es de importancia para el medio ambiente debido a que estos organismos brindan distintos servicios ecosistémicos. Entre los cuales destaca, control de plagas en plantaciones de importancia económica, los niveles de eutroficación en sistemas acuáticos, control de vectores, entre otros (Díaz – García, *et al.*, 2019). Sin embargo, desempeñar estos roles se ve afectado por declives en sus poblaciones. Principalmente al ser vulnerables a los cambios en el ambiente; tales como la contaminación o destrucción del hábitat, la introducción de especies, la aparición de enfermedades, los insecticidas, bacterias, virus y hongos (Bosch, 2003).

Aunque actualmente *Agalychnis moreletii* y *Agalychnis callidryas* no presenta un declive significativo en sus poblaciones, se puede manifestar un descenso en ella a largo plazo. Al igual que para *Ptychohyla hypomykter*. Debido a la tendencia decreciente que están experimentando por acciones climáticas, enfermedades y efecto humano (IUCN, 2020). Las consecuencias de que disminuyan las poblaciones pueden causar un declive de la diversidad genética, haciendo a las poblaciones más susceptibles a los cambios en su ambiente lo que puede llevarlas a la extinción.

El presente trabajo determinará la diversidad genética poblacional de *A. moreletii*, *A. callidryas* y *P. hypomykter* en diferentes sitios de Centroamérica. Para determinar los niveles de diversidad genética en las diferentes especies Para el cual se obtuvo secuencias de los organismos en distintas regiones, y de esta forma se llevó cabo análisis estadísticos. Determinando así las posibles causas de la diversidad encontrada, y que poblaciones son prioritarias para la conservación de las especies.

## II. OBJETIVOS

### A. General

Determinar la diversidad genética poblacional de tres especies de Hyliade en Centroamérica.

### B. Específicos

1. Determinar si existen diferencias en la diversidad genética entre poblaciones de *A. moreletii* con diferente grado de perturbación.
2. Inferir si las poblaciones de estas especies han experimentado una reducción de sus individuos y las probables causas.
3. Proponer estrategias para la conservación de *A. moreletii* en Guatemala en base a los análisis genéticos.

### III. JUSTIFICACIÓN

Los anfibios son organismos importantes para los ecosistemas acuáticos y terrestres. Cumplen diversos roles en la cadena trófica, como detritívoros, consumidores primarios y secundarios. Además, brinda distintos servicios ecosistémicos, como bioindicadores, y control biológico de plagas.

Aunque, actualmente *A. moreletii* y *A. callidryas* se encuentran listados como especies de preocupación menor debido a la resistencia que presenta a la alteración y degradación de su hábitat. La tendencia poblacional es decreciente (IUCN SSC Amphibian Specialist Group, 2017, 2020). De igual forma, *P. hypomykter* se cataloga como una especie vulnerable (IUCN SSC Amphibian Specialist Group, 2020). Por lo que en estas tres poblaciones de Hylidae las amenazas podrían llevarla a un deterioro de su población; en especial por su dependencia a la época lluviosa para reproducirse (Roberts, 1994; Savage, 2002). Por lo que, con los eventos de cambio climático, los periodos lluviosos serán menos predecibles y se podría ver una tendencia hacia la disminución de la cantidad y frecuencia. También, la degradación y destrucción de hábitat por la agricultura, la tala y la contaminación (Wilson y McCranie, 2004), son factores que afectan a las especies, creando aislamiento entre las poblaciones. Además, en las especies del género *Agalychnis* se enfrentan al comercio ilegal, ofrecidas para la venta en el comercio internacional de mascotas (IUCN SSC Amphibian Specialist Group, 2017, 2020). En cambio, para *P. hypomykter* el tamaño poblacional y su distribución restringida (Duellman, 1970) afectan a la especie.

Por ello es necesario monitorear las poblaciones de cada especie para determinar las acciones a seguir en su conservación. Haciendo uso de herramientas genéticas para ampliar y complementar la información acerca de los organismos. Debido a que los estudios elaborados para estas especies no se tomaron en cuenta la diversidad genética. Utilizando herramientas de biología molecular.

Se podrá conocer si existe flujo genético entre las poblaciones. Conocer cuán variables o poco variables son genéticamente las especies de interés. Permitiendo establecer si estas zonas son centros de diversidad genética que ayudan a la conservación del espécimen. Por lo que, el presente trabajo será relevante para ampliar y complementar la información que se conoce sobre *A. moreletii*, *A. callidryas* y *P. hypomykter*. Ayudando a contribuir en la conservación de estas especies, proveyendo información para implementar estrategias de manejo y conservación.

## IV. MARCO TEÓRICO

### A. Concepto de diversidad biológica

La diversidad biológica, o bien la biodiversidad, se refiere al conjunto de ecosistemas, especies y diversidad genética (terrestre, marino y acuático). Comprende la variabilidad de los organismos vivos, así como su ecología. Por lo que se puede estudiar un ecosistema, las especies dentro de los ecosistemas, razas, entre otros (Martínez, 2008; FAO, 2019).

La biodiversidad, es de importancia debido a que presta servicios ecosistémicos para el bienestar humano (Organización Mundial de la Salud, 2020). Los bosques, por ejemplo, brindan alimento, materiales de construcción, medicinas, plaguicidas, entre otros. Constituyen un 60% de almacenes de carbono aéreo, y un 30% del suelo. Es importante en la regulación del clima, por sus efectos en la temperatura y la humedad relativa. Además, absorben la radiación solar transformándola con la fotosíntesis. Sin embargo, durante la última década se ha visto afectada por la deforestación, cambio climático, desertificación y el crecimiento de la población (Balvanera, 2012). Esto afecta al ser humano a largo plazo en la viabilidad, la productividad, disponibilidad de bienes y servicios. Generando como consecuencias cambios de la distribución de animales, agentes patógenos, plantas e incluso asentamientos humanos (Organización Mundial de la Salud, 2020).

Es por ello que existe un interés por preservar la biodiversidad. Debido a que han representado un valor biológico y de sostenibilidad para los ecosistemas (Martínez, 2008).

La diversidad genética, son todas las variaciones heredables en cada organismo, entre los individuos de una población y entre poblaciones dentro de una especie. Esto es determinante en su capacidad de adaptación a las variaciones del ambiente e incluso a los efectos de la perturbación humana (Campbell y Reece, 2007). Es importante conservar la diversidad genética ya que es el potencial evolutivo de las especies frente a posibles respuestas (físico y/o biológico). Puesto que a mayor variabilidad las especies tienen mayor probabilidad de sobrevivir. Sin embargo, el estudio de la variabilidad genética de las especies silvestres, es poco conocida (Randall, *et al.*, 2008).

### B. Medidas de diversidad genética

Existen diversos parámetros, indicadores y medidas para estimar la diversidad genética en una población. Se puede emplear la variabilidad fenotípica, pedigrí, marcadores moleculares, secuencias de genes mitocondriales y nucleares (Martínez, 2008).

La variabilidad fenotípica, como su nombre lo indica, consiste en utilizar características físicas. Sin embargo, utilizar únicamente esta herramienta puede ser inconveniente, ya que este factor depende del ambiente y este no suele ser uniforme en la misma especie. Además, entra en juego que los caracteres fenotípicos presentan distinta

heredabilidad, por lo que difieren físicamente, en algunos casos, organismos de la misma especie (Martínez, 2008).

El pedigrí, es otra herramienta similar a la variabilidad fenotípica, se construye a través de la genealogía. Se construye utilizando un rasgo o enfermedad, presente o ausente en las generaciones (Elston y Stewart, 1971). Por lo que se podría calcular parámetros como el tamaño efectivo, el nivel y crecimiento por generación de endogamia, coeficientes de parentesco, entre otros. Sin embargo, no siempre se cuenta con esa información, por lo que no es factible la obtención de esa información, principalmente en especies salvajes (Martínez, 2008).

Por ello, la utilización de los marcadores moleculares ha sido la más utilizada para estudiar la diversidad genética. Principalmente, porque se utiliza una zona de ADN que no se codifica en proteínas y por tanto se puede conocer cómo ha evolucionado la variabilidad, por acciones de la deriva genética o cuellos de botella. Se emplea por tanto marcadores moleculares de tipo microsátélites o SNP (Martínez, 2008), así como nucleares y mitocondriales (Becerra y Paredes, 2000).

### **C. Biología molecular en la conservación de especies**

A medida que las técnicas moleculares han ido avanzando a lo largo del tiempo, estas se han vuelto indispensables para los problemas genéticos. Empleándolo para determinar las relaciones que existen entre los individuos, poblaciones y especies (Haig, 1998). Por lo que se han aplicado en la biología de la conservación de especies, principalmente para el estudio de especies en riesgo de extinción (Landweber y Dobson, 1999).

La estructura genética de poblaciones naturales ha sido afectada por la destrucción, fragmentación de su hábitat, contaminación, calentamiento global, introducción de especies exóticas y la sobreexplotación de los recursos naturales (Lande, 1999).

Principalmente, porque es importante mantener niveles adecuados de diversidad genética inter e intra poblacional. Debido a que, si algunos de estos factores afectan a una población, la supervivencia no puede ser asegurada (Haig, 1998).

Para el estudio de genética de poblaciones se han empleado marcadores moleculares que aportan datos para elaborar medidas a favor de la conservación de especies. (Lanteri *et al.*, 2002). Se han empleado marcadores de ADN de tipo RFLP (análisis de polimorfismo para la longitud de fragmentos de restricción), RAPD (análisis al azar de polimorfismos de ADN), huellas digitales de ADN y secuenciación de ADN mitocondrial (Soltis *et al.*, 1998); los cuales son fundamentales para el monitorio de las poblaciones (Samways, 1994).

Se obtiene información de los límites de las poblaciones, su estructura, los patrones de migración, flujo génico interpoblacional, y detección de declive ante su hábitat (Avise y Hamrick, 1996). Por ello, se ha convertido en una herramienta importante para la biología de la conservación, ya que al estudiar las poblaciones se podría evitar la extinción de las especies. Desarrollando estrategias de conservación, tales como corredores biológicos, restauración de áreas degradadas, translocación de individuos de poblaciones, entre otros (Landweber y Dobson, 1999; Loo, 2011).

#### **D. El genoma mitocondrial**

El ADN mitocondrial (ADNmt) es una molécula circular, reportando en algunas especies 19,904 pares de nucleótidos contenida en las mitocondrias (Vázquez, Gómez y Malo, 1995; Huang *et al.*, 2019). Además, se caracteriza por ser heredado por línea materna, y por presentar una alta tasa de mutación y fijación (Vázquez, Gómez y Malo, 1995; FAO, 2017). De esta forma al implementar marcadores mitocondriales permite la reconstrucción de las relaciones evolutivas de las especies y la detección de hibridación *entre* especies (FAO, 2017). Sin embargo, dependiendo de la región a estudiar se obtienen distinta información.

Las secuencias mitocondriales de la subunidad 16S del ARN ribosómico, se caracteriza por ocupar 1/10 del genoma mitocondrial completo. Así como se han reportado que posee numerosas sustituciones de nucleótidos (Yang *et al.*, 2014). Es el más utilizado para elaboración taxonómica y determinación de la variabilidad genética de distintas especies (Paternina, Verbel – Vergara y Bejarano, 2016). En anfibios se ha demostrado que está región es más efectiva para estudios genéticos que el COI (Vences *et al.*, 2005). Sin embargo, al conformar solo una parte del genoma, la información que proporciona es mínima. Por ello, se puede complementar los estudios con más marcadores moleculares que codifican para distintas regiones

El uso del gen citocromo b (Cyt *b*) es una buena alternativa para complementar la información, ya que nos permite comparar entre especies del mismo género o la misma familia (Castresana, 2001). Estableciendo relaciones taxonómicas, y a la vez permite determinar la variación genética intra e interespecífica de poblaciones (Rosero – Galindo, Montenegro – Coral y García – López, 2015). De esta forma la aplicación de distintos marcadores codificantes para regiones específicas del gen mitocondrial puede ampliar la información de las poblaciones o la especie.

#### **E. Estrategias de conservación de recursos genéticos**

Conociendo cómo se comporta la población, se podrían establecer métodos o estrategias para conservar a la especie o recurso de interés. Debido a que se identifica las poblaciones que contribuyen a la diversidad genética global y por lo tanto posee un mayor potencial para el aumento de la diversidad del recurso genético (FAO, 2019). Por lo que hay que tomar en cuenta la evaluación de:

- La diversidad de caracteres, combinaciones reconocibles de características fenotípicas que definen a la especie.
- La diversidad genética molecular.
- Evidencia de aislamiento genético en el pasado a consecuencia de un aislamiento.

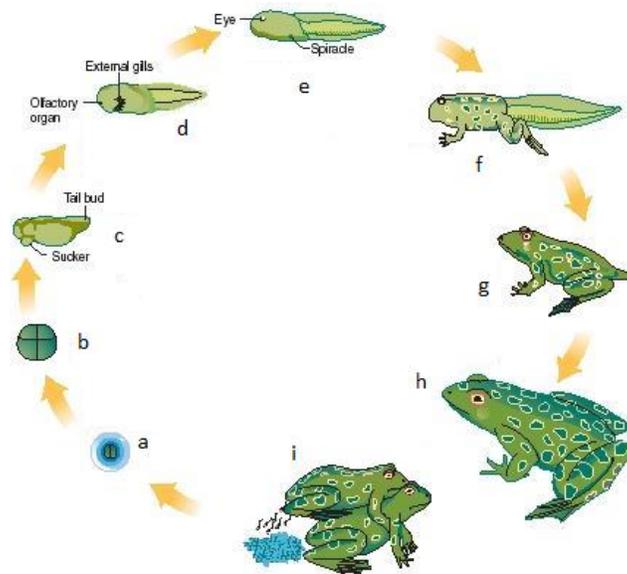
(FAO, 2019)

Debido a que se debe tener un nivel amplio del estudio de una especie o población, es importante considerar la importancia que tiene para el ambiente e inclusive para el ser humano. Por lo que, la biodiversidad juega un papel importante para lograr conservar los recursos genéticos, ya que si no se preserva la variabilidad la existencia de los mismo disminuirá afectando al ecosistema y los seres humanos (Estrella, *et al.*, 2005). Por ello, debe seleccionarse un modelo que requiera de estrategias de auto sostenimiento.

## F. Generalidades de Anura

Las ranas (Orden: Anura) son el grupo más diverso y extendido de los tres órdenes de anfibios que existen. Se encuentran en todos los continentes, exceptuando la Antártica, algunas islas oceánicas y desiertos xéricos. Reportando así más de 6,200 especies alrededor del mundo, donde la mayor diversidad se encuentra en los trópicos, adjudicándoles más de 4,000 especies (Heying, 2003; Miller y Fowler, 2015).

Los anuros, son tan diversos, ya que han logrado adaptarse a distintos ecosistemas: acuático, acuático – terrestre, terrestre, arbóreo y fosorial (Dodd, 2010). Debido a sus distintos estilos de vida y sinapomorfias, se han reportado más de 54 familias (Heying, 2003; Miller y Fowler, 2015). Morfológicamente poseen algunas diferencias según sus adaptaciones a su hábitat, pero no en su ciclo de vida (Figura 1), a excepción de algunos géneros.



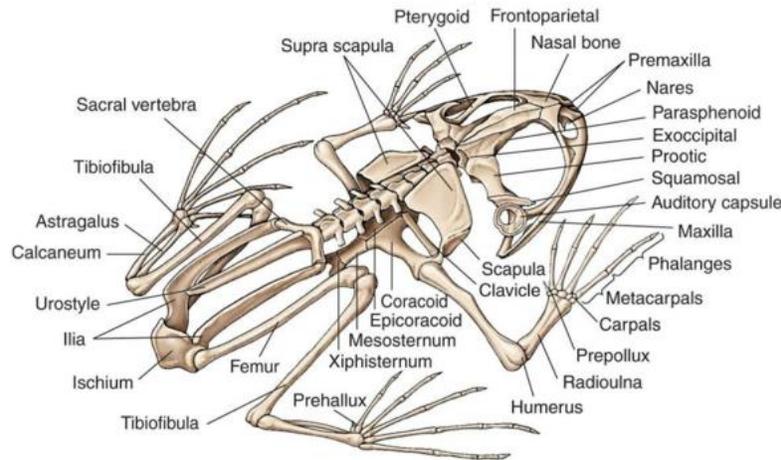
**Figura 1.** Ciclo de vida Anura. a) Los huevos se rodean por una cubierta gelatinosa, b) segmentación del huevo, c) el embrión se nutre del vitelio, esbozo de la cola, d) un pliegue cutáneo crece cubriendo las branquias externas, e) el agua sale por el espiráculo, f) patas posteriores y anteriores emergen, g) la cola se acorta por reabsorción, metamorfosis casi completa, h) rana sexualmente madura a los 3 años, i) ranas en amplexo, los huevos fecundados se depositan.

(The Gale Group, 2006)

En la fase larval (Figura 1, c – f) son acuáticas (renacuajos), por lo que poseen branquias internas y la ausencia de dientes verdaderos, puesto que se alimentan de algas (Heying, 2003; Duellman y Zug, 2019).

Por otra parte, en la etapa adulta (Figura 1, h – i), su principal característica, y tal como lo sugiere el nombre del orden, es que no posee cola. Posee entre nueve o menos vértebras; en donde las tres y cuatro posteriores al sacro se fusionan formando el uróstilo. El radio y el cúbito, la tibia y el peroné se fusionan entre sí. Además, el astrágalo y el calcáneo,

son muy alargados, lo que permite saltar (Figura 2). El dentario, carece de dientes, pero el maxilar y el premaxilar generalmente los poseen. La lengua es a menudo grande y libre posteriormente. Su intercambio de gases es a través de la piel, y complementa el oxígeno que reciben los pulmones. Los machos de la mayoría de las especies tienen sacos vocales; y su fertilización es externa, adoptando una postura de apareamiento llamada amplexus (Heying, 2003; Miller y Fowler, 2015; Dodd, 2010).



**Figura 2.** Anatomía de Anura. Esquema anatómico básico de la conformación de Anura.

(Hickman, Roberts y Larson, 1998)

### G. Anfibios y servicios ecosistémicos

Los servicios ecosistémicos se refieren a los beneficios que los humanos obtienen de los ecosistemas. Estas se catalogan en cuatro: servicios de regulación (ej.: control de plagas y regulación de clima), servicios de provisión (ej.: alimentos y medicamentos), servicios culturales (ej.: beneficios espirituales y recreativos) y servicios de apoyo (ej.: ciclo de nutrientes y productividad primaria) (Díaz – García, *et al.*, 2019).

Entre los servicios ecosistémicos que los anfibios prestan se encuentran la regulación de los niveles de eutroficación en ecosistemas acuáticos, control de las poblaciones de insectos, de los cuales algunos son portadores de enfermedades para el ser humano y/o son plagas para cultivos de importancia económica (Díaz – García, *et al.*, 2019). Un ejemplo más concreto es *Eleutherodactylus coqui*, la cual ayuda en la estabilidad y resiliencia de los ecosistemas. Estos incrementan los nutrientes esenciales mejorando la disponibilidad para plantas y el desarrollo de follaje. Así mismo, ayuda al flujo de energía mediante la producción de biomasa y acelera la descomposición (Valencia – Aguilar, *et al.*, 2013).

Además, en estudios sobre los hábitos alimenticios de *Osteopilus septentrionalis* y *Lysapsus limellus*, determinaron que estos anuros consumen larvas de *Culex pipiens quinquefasciatus*, (moscas de la familia Ephydriidae causantes de Filariasis) y libélulas (Menin y Giaretta, 2006; Valencia – Aguilar, *et al.*, 2013). Por otro lado, se determinó que los anuros, en general, son importantes controladores biológicos en cultivos de importancia económica. Tal como en Argentina, en donde se evidenció en cultivos de soya transgénica,

la cual es afectada por una alta diversidad de insectos que ataca a la plántula causando múltiples daños (Valencia – Aguilar, *et al.*, 2013).

Por otro lado, debido a sus características morfológicas y fisiológicas son excelentes indicadores de calidad de agua. Puesto que su piel es muy permeable a contaminantes disueltos en el agua, lluvia ácida o radiaciones (Valencia – Aguilar, *et al.*, 2013).

## **H. Amenazas para las poblaciones de anfibios**

Debido a que los anfibios presentan requerimientos específicos en el hábitat, se genera una dependencia al ambiente donde viven, y junto a su baja movilidad y su doble ciclo de vida (acuático y terrestre), son vulnerables a los cambios en el ambiente (Bosch, 2003).

Se ha observado que el declive en sus poblaciones se debe a contaminación o destrucción del hábitat y la introducción de especies como los peces, cangrejos, u otros anfibios, los cuales depredan las larvas provocando la disminución de la población. También, la aparición de enfermedades, como infecciones en la piel, la malformación o ausencia de las patas traseras les afecta (Bosch, 2003). Se ha observado declives de las poblaciones en zonas de Mesoamérica, América del sur, el Caribe, Australia, Asia y Países Bajos, originados por dichas causas (Berger *et al.*, 1998; Stuart *et al.*, 2004; Lips *et al.*, 2005; Martel *et al.*, 2013).

La presencia de trematodos puede afectar a los anfibios ya que parasitan las larvas y hacen que se produzcan malformaciones. Tal como el caso de *Ribeiroia ondatrae*, el cual altera la posición de grupos de células y libera sustancias químicas que provocan las malformaciones (Bosch, 2003).

Los insecticidas, también son otra fuente de amenaza para los anfibios. Principalmente porque se ha demostrado que las concentraciones elevadas de estos productos químicos disminuyen la inmunología de los anfibios, haciéndolos más susceptibles a los parásitos (Bosch, 2003).

Sin embargo, los agentes más nocivos para estos organismos son las bacterias, los virus y los hongos. Bacterias como *Aeromonas hydrophila*, que se encuentran en el suelo y agua, es la responsable del síndrome de pierna roja (Red-leg syndrome). En grandes cantidades y concentraciones de la bacteria, causa hemorragias internas e inflamaciones, en larvas o adultos (Emerson y Norris, 1905; Bosch, 2003).

En el caso de los virus, los Iridovirus son los agentes causales de disminuir las poblaciones. Sin embargo, su baja especificidad hace que sean muy difíciles de controlar, así como se desconoce los factores ambientales en los cuales se desarrollan (Bosch, 2003).

Los patógenos más dañinos para anfibios han sido los hongos quitridios, *Batrachochytrium dendrobatidis* y *B. salamandrivorans*, causantes de la quitridiomycosis (Berger *et al.*, 1998; Martel *et al.*, 2013). Estos colonizan las capas queratinizadas de la piel en anfibios adultos (Berger *et al.*, 1998). Las larvas que entran en contacto con este hongo son afectadas en la zona bucal. Al momento de seguir desarrollándose el hongo los afecta más en su etapa adulta. El cual dificulta la respiración cutánea, por lo que el animal termina asfixiado (Bosch, 2003).



2001; Savage, 2002). En algunas ocasiones la espalda es marcada líneas tenues transversales en verde oscuro, o con pequeños puntos blancos (Villa, 1972).

Sus larvas se desarrollan en pozas temporales o permanentes. Su ciclo reproductivo es dependiente de la época lluviosa, comenzando en junio aproximadamente y terminando en noviembre (Roberts, 1994; Savage, 2002). Depositán sus huevos en hojas suspendidas sobre la superficie del agua. Al eclosionar las larvas caen en la fuente de agua, en donde se desarrollan por dos meses (Duellman, 1970).

Se distribuye en la vertiente Atlántica desde el sureste de Veracruz y norte de Oaxaca, México, hasta el caribe central de Panamá (Figura 4) (Morera y Jiménez, 2017). Se encuentra en altitudes desde el nivel del mar hasta 1325 msnm (Savage, 2002). Actualmente, la IUCN SSC Amphibian Specialist Group (2020) cataloga a esta especie como de menor preocupación. Sin embargo, la tendencia de la población va en decrecimiento, debido a las amenazas que afecta a los anuros.



**Figura 4.** Mapa de distribución de *A. callidryas*.

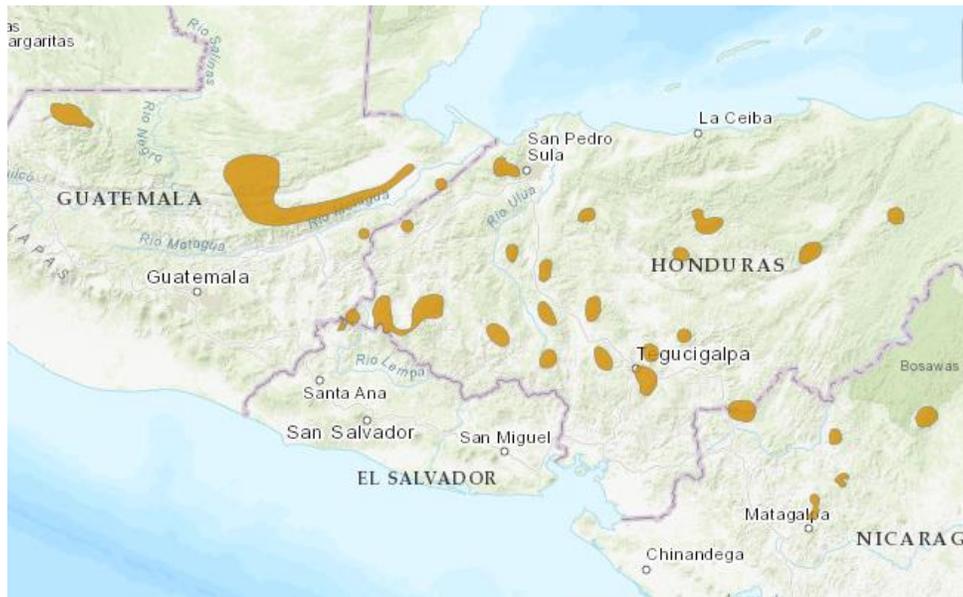
(IUCN SSC Amphibian Specialist Group, 2020)

### **K. *Ptychohyla hypomykter***

La rana de arroyo de Copán, pertenece a la familia Hylidae, alcanza entre 32.4 – 37.5 mm (machos) y entre 37.5 – 46.1 mm (hembras) (McCraine y Wilson, 1993). Presenta flancos con patrones moteados o manchados, su coloración dorsal se caracteriza por la ausencia de manchas verdes; y la coloración del iris es bronce (Duellman y Campbell, 1982).

Sus larvas se desarrollan en aguas poco profundas o en lagunas con fondo de grava, en los arroyos donde descansan y se alimentan (Duellman, 1970). Al igual que las otras especies de Hylidae su reproducción se ve influenciada por la época lluviosa (Roberts, 1994; Savage, 2002).

Se distribuye en regiones montañosas, desde el centro – oeste de Guatemala hasta el centro – norte de Nicaragua en la vertiente del Atlántico y del suroeste al centro – sur de Honduras en el Pacífico; a excepción de la Cordillera Nombre de Dios del centro – norte de Honduras (Figura 5). Se encuentra en altitudes desde los 600 - 2070 msnm (Duellman. 1970). Actualmente, la IUCN SSC Amphibian Specialist Group (2020) cataloga a esta especie como vulnerable. Con tendencia poblacional decreciente, debido a las amenazas que afecta a los anuros.



**Figura 5.** Mapa de distribución de *P. hypomykter*.

(IUCN SSC Amphibian Specialist Group, 2020)

## V. METODOLOGÍA

Para llevar a cabo el análisis genético de las tres especies de Hylidae se utilizaron secuencias de la región Centroamericana. Siendo para *A. moreletii* en zonas de Guatemala y El Salvador. Para *A. callidryas* Costa Rica y Panamá; y para *P. hypomykter* de Honduras y Nicaragua (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Poblaciones de las especies de Hylidae estudiadas en la región Centroamericana. Se muestran divididas las poblaciones en base al país del que provienen y de la zona sur, norte o central de cada uno.

Especie	País	Departamento	Área	Zona
<i>A. moreletii</i>	Guatemala	Quetzaltenango Escuintla Suchitepéquez Suchitepéquez Guatemala	RNP Patrocinio Finca La Gracia Reserva natural Tarrales Los Andes El Naranjo	Sur
		Zacapa Alta Verapaz Alta Verapaz	Finca Dulce Rocío RNP Sac Wach Já, Las Nubes	Norte
	El Salvador	Santa Ana	Parque Los Andes	Sur
<i>A. callidryas</i>	Costa Rica	Puntarenas Puntarenas Puntarenas Puntarenas Limón Limón	Uvita Sierpe Pavones Rincón Osa (Campo) Manzanillo Cahuita	Sur
		Guanacaste Alajuela Heredia Heredia  Heredia Puntarenas Puntarenas	Tilarán San Ramón Siquirres Estación La Selva Biológica Universidad Earth Playa Bandera Reserva Cabo Blanco	Norte
	Panamá	Veraguas Panamá Coclé Coclé	Santa Fe Gamboa El Valle Parque Nacional El Cope	Centro

Especie	País	Departamento	Área	Zona
<i>A. callidryas</i>	Panamá	Bocas del Toro Bocas del Toro	Chiriquí Almirante	Sur
<i>P. hypomykter</i>	Honduras	Olancho Olancho Olancho Santa Barbara Comayagua	Agua Buena PN Montana Botaderos Montana de Jacaleapa PN Montana de Santa Barbara PN Montana Comayagua	Sur
		PN Pico Pijol Cortes Cortes Copán Yoro	Pino Alto PN Cusuco PN Cerro Azul Meambar PN Cerro Azul Copán PN Pico Pijol	Norte
	Nicaragua	Jinotega Jinotega R.A.A.N. Matagalpa	RN Penas Blancas RN Cerro Kilambe PN Saslaya RP Selva Negra	Norte

## A. Áreas de estudio

### 1. *Agalychnis moreletii*

El departamento de Zacapa limita al norte con Alta Verapaz e Izabal, al sur con Chiquimula y Jalapa, al este con la República de Honduras y al oeste con El Progreso. Se encuentra en la región Oriente a 14°58'45'' y 89°31'20'', posee una extensión territorial de aproximadamente 2690 km<sup>2</sup>, y su altura media se encuentra a 185 msnm. Se compone en su mayoría de áreas montañosas, parte de la Sierra de las Minas y Cerro Miramundo. Posee una temperatura promedio anual máxima entre 27 – 35.9 °C, y una mínima de 21.3°C. Así como una humedad relativa de 74%, y una precipitación pluvial media anual entre 750 – 1000 mm (Ministerio de Economía, 2017).

La Finca Dulce Rocío (Figura 6), ubicada cercana al bosque municipal de La Unión, se encuentra en un rango de altitud de 1000 – 1500 msnm. Posee una temperatura máxima de 36.4 °C y una mínima de 11 °C. Su precipitación varía de 1869 – 1397 mm/año. La humedad relativa va de 59% a 87% (Recinos, *et al.*, 2012).

La Unión, se caracteriza porque dentro de la región se encuentra la salamandra *Cryptotriton monzoni*, endémica de estos bosques y en peligro crítico de extinción. También se encuentran otras especies de interés, como *Bromeliophyla bromeliacia*, *Ptychohyla hypomykter*, *Bolitoglossa conanti* y *Bolitoglossa rufescens* (Recinos, *et al.*, 2012).

Por otra parte, el departamento de Alta Verapaz limita al norte con Petén, al este con Izabal, al sur con El Progreso, Baja Verapaz y al oeste con El Quiché. Se encuentra en la región Norte a 15°29'00'' y 90°19'35'', posee una extensión territorial de aproximadamente 8686 Km<sup>2</sup>, y su altura media se encuentra a 1317 msnm. Se compone por regiones sumamente quebradas, así como de montañas y cerros. Entre los que sobresalen las sierras de Chuacús, sierra Chamá y sierra Las Minas. Posee una temperatura promedio entre los 21

– 17 °C, con humedad relativa de 88%, y una precipitación pluvial media anual es de 2,000 mm. Por lo que, la mayor parte del departamento es destinado a cultivos perennes y fines agrícolas (Tobar y Gramajo 2007; Ministerio de Economía, 2017).

El área privada protegida Sac Wach Já (Figura 6), se localiza cercano a San Cristóbal Verapaz, Alta Verapaz, entre los 1,480 msnm aproximadamente. Se encuentra aproximadamente a 223 kilómetros de la ciudad capital. Su temperatura oscila entre los 23 – 16 °C. Posee una precipitación anual promedio de aproximadamente 3,250 mm (Ramírez, 1998).

Sac Wach Já cuenta con de 670 hectáreas, del cual un 33% se compone de bosque alto, un 50% al bosque bajo y un 9% a pasto o matorral. Además, aunque la finca no cuenta con ríos con amplio caudal, si se encuentran pequeños nacimientos dispersos dentro del área (Ramírez, 1998). Por lo que se elaboró la evaluación de los recursos forestales de la finca por el Ing. Forestal Artemio (Ramírez, 1998); una determinación taxonómica de especímenes de helechos arborescentes de la familia Cyatheaceae por el Ing. Agr. Mario Véliz (2015), y una Evaluación Ecológica Rápida (EER) llevada a cabo en 2018 por los estudiantes del curso de Evaluación Ecológica de la Universidad del Valle de Guatemala.

También se encuentra la finca Las Nubes (Figura 6), el cual anteriormente era una plantación de café. Sin embargo, actualmente el dueño de la finca cambio a una actividad maderable con el fin de darle un enfoque de conservación a la finca (com pers. PhD. Alejandra Zamora).

El departamento de Quetzaltenango limita al norte con Huehuetenango al este con Totonicapán y Sololá, al sur con Retalhuleu y Suchitepéquez, y al oeste con San Marcos. Se encuentra en la región Sur-Occidente a 14°50'16'.’ y 91°31'03'’, posee una extensión territorial de aproximadamente 1951 Km<sup>2</sup>, y su altura oscila entre 2,800 – 350 msnm. Por lo tanto, se compone de cerros altos, barrancos, precipicios, valles y llanuras. Así como, sobresalen los volcanes Santa María, Santiaguito, Cerro Quemado, Siete Orejas, Chicabal y Lacandón. Debido a ello su clima es muy variado, con temperaturas entre los 28 – 36 °C entre enero a abril, en diciembre a febrero 15 – 20 °C. La humedad relativa es de 82% y la precipitación pluvial media anual es de 2,970 m y se desarrolla durante mayo a octubre. Debido a ello, la mayor parte del departamento es para fines agrícolas, pecuarios y agropecuarios. (Tobar y Gramajo 2007; Ministerio de Economía, 2017).

La RNP Patrocinio (Figura 6) se localiza en la aldea Palajunoj, El Palmar, Quetzaltenango, entre los 800-950 msnm. Se encuentra aproximadamente a 216 kilómetros de la ciudad capital, cercana al volcán Santiaguito. Su temperatura oscila entre los 32 – 20 °C. Posee una precipitación anual de aproximadamente 4,500 mm entre los meses de abril y diciembre. (RNP Patrocinio, 2018).

Patrocinio cuenta con más de 140 hectáreas, del cual un 65% es dirigido al ponicultivo con plantaciones de macadamia, frutas tropicales, café, cacao orgánico y aguacate (Alvarez-Yax *et al.*, 2018; RNP Patrocinio, 2018); el 35% restante es destinado a la conservación de bosque tropical húmedo (Alvarez-Yax *et al.*, 2018). Además, la reserva cuenta con cuatro ríos provenientes de Concepción, Tambor, la Pringador y el río Dolores; así como de varios nacimientos que se encuentran dentro de la reserva. (RNP Patrocinio,

2018). Debido a ello, se han realizado dos Evaluaciones Ecológicas Rápidas (EER) llevadas a cabo en 2014 por Alarcón *et al.*, y en 2017 por Alvarez-Yax *et al.* En donde se determinó como principales resultados un total de 297 especies que incluye mariposas, escarabajos, murciélagos, mamíferos medianos, anfibios, reptiles y aves.

Escuintla, por otro lado, tiene una extensión territorial de 4384 km<sup>2</sup> con dos áreas topográficas denominadas norte y sur. La primera comprende a la sierra Madre, por lo que cuenta con grupos volcánicos, entre los cuales destaca el Pacaya. Además, presenta crestas, altiplanicies dilatadas, desfiladeros y barrancos profundos. En cambio, en la zona sur, denominada Costa Grande, se encuentran que extensas planicies. Las cuales son aprovechadas por múltiples actividades industriales, agrícolas y ganaderas. También, se encuentra el canal de Chiquimulilla, que se extiende en paralelo a al Océano Pacífico hasta la frontera con El Salvador (Solórzano, 2009). En esta región se localiza la finca La Gracia (Figura 6).

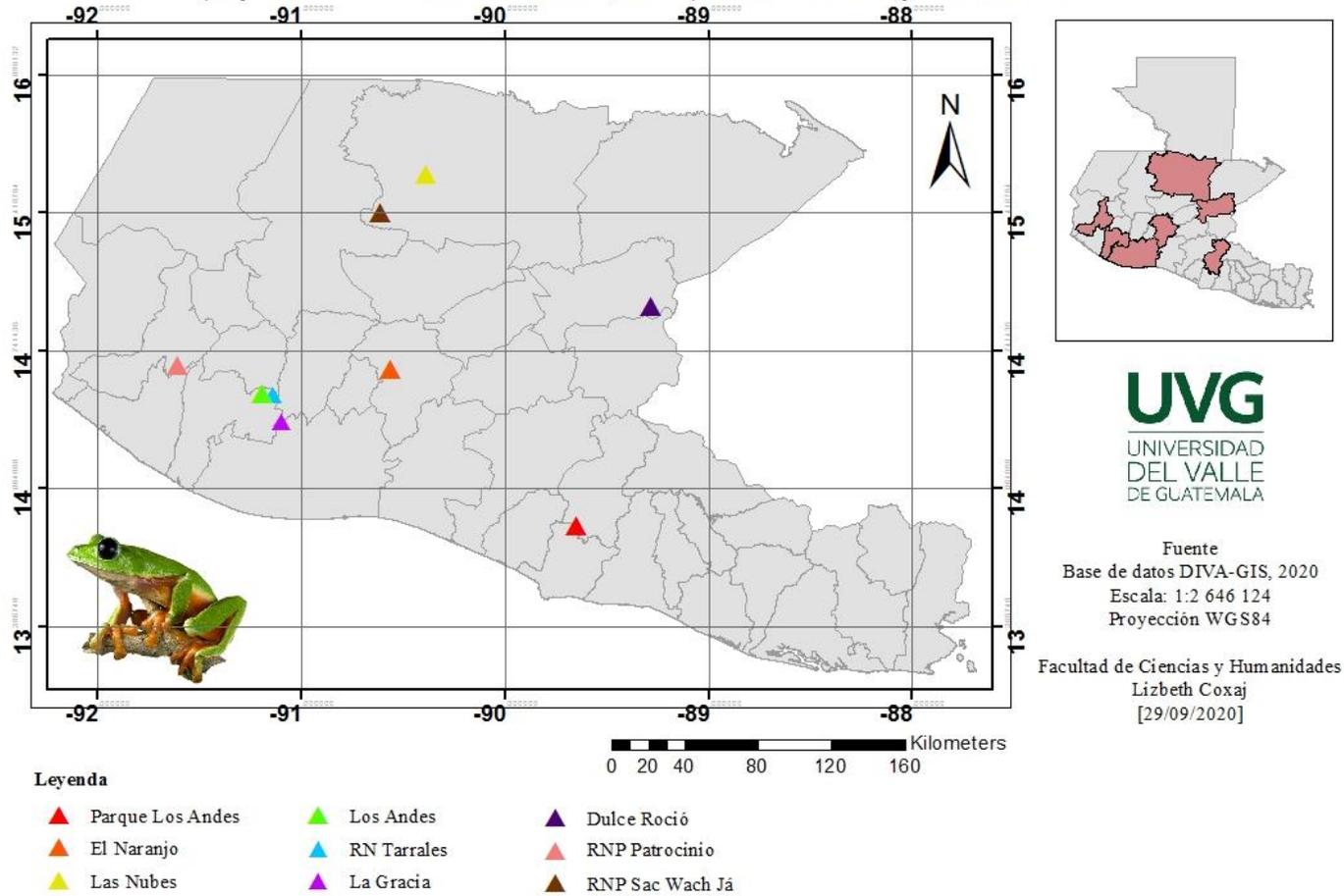
Suchitepéquez se encuentra situado en la región Sur Occidental de Guatemala. Posee una extensión territorial de 2510 km<sup>2</sup>. Al sur se encuentran planicies, lo que facilita los cultivos, siendo utilizados por cultivos anuales o temporales, así como permanentes y semipermanentes (INE, 2010). En esta región se encuentran las fincas los Andes y Reserva natural Tarrales (Figura 6).

La Reserva Los Tarrales, se encuentra cercana al volcán Atitlán al sur de Guatemala. El área protege el bosque prístino de la pendiente superior del volcán a 3000 – 700 msnm Cuenta con bosque nuboso por encima de los 1800 msnm y con bosques latifoliados húmedos, intercalados con plantaciones de café y ornamentales. Además, protege una cuenca hidrográfica que proporciona agua potable a varias comunidades. Anteriormente, en 1874, la finca fungía principalmente con cultivos de café y caña de azúcar. No fue hasta que en el 2001 se estableció en la red de áreas protegidas de Guatemala. Por lo que hoy en día se enfoca en la conservación. Ayudando a conservar especies como el venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*), cotuza (*Dasyprocta punctata*), chachalaca de vientre blanco (*Ortalis leucogastra*), pava crestada (*Penelope purpurascens*), Puma (*Puma concolor*), entre otros (Los Tarrales Natural Reserve, 2020).

La ciudad de Guatemala, posee una extensión territorial de 22,500 – 35,000 ha. En los últimos doce años se ha producido más suelo urbano que en los 218 años de ocupación (Municipalidad de Guatemala, 2020). En esta área se encuentra la población de El Naranjo, ubicada en Mixco (Figura 6).

Por último, El Salvador, limita al Norte y al Este con Honduras, al Oeste con Guatemala y al Sur con el Océano Pacífico. Se encuentran 14 departamentos agrupados geográficamente en tres zonas: Oriental (Usulután, San Miguel, Morazán y La Unión), Central (La Libertad, Chalatenango, Cuscatlán, San Salvador, La Paz, Cabañas y San Vicente) y Occidental (Ahuachapán, Santa Ana y Sonsonate). En las que dos cadenas montañosas atraviesan el país, de este a oeste, dejando una meseta de 600 metros de altitud. Su punto más elevado es el cerro El Pital, perteneciente a la Sierra Madre, que nace en México y atraviesa Guatemala, El Salvador y Honduras; Además, existen numerosos volcanes (Ministerio de Asuntos Exteriores, Unión Europea y Cooperación, 2020). En esta zona se encuentra la población del parque Los Andes, en Santa Ana (Figura 6).

**Distribución geográfica de las poblaciones de la rana de ojos negros  
(Hylidae: *A. moreletii* Duméril, 1853) en Guatemala y El Salvador**



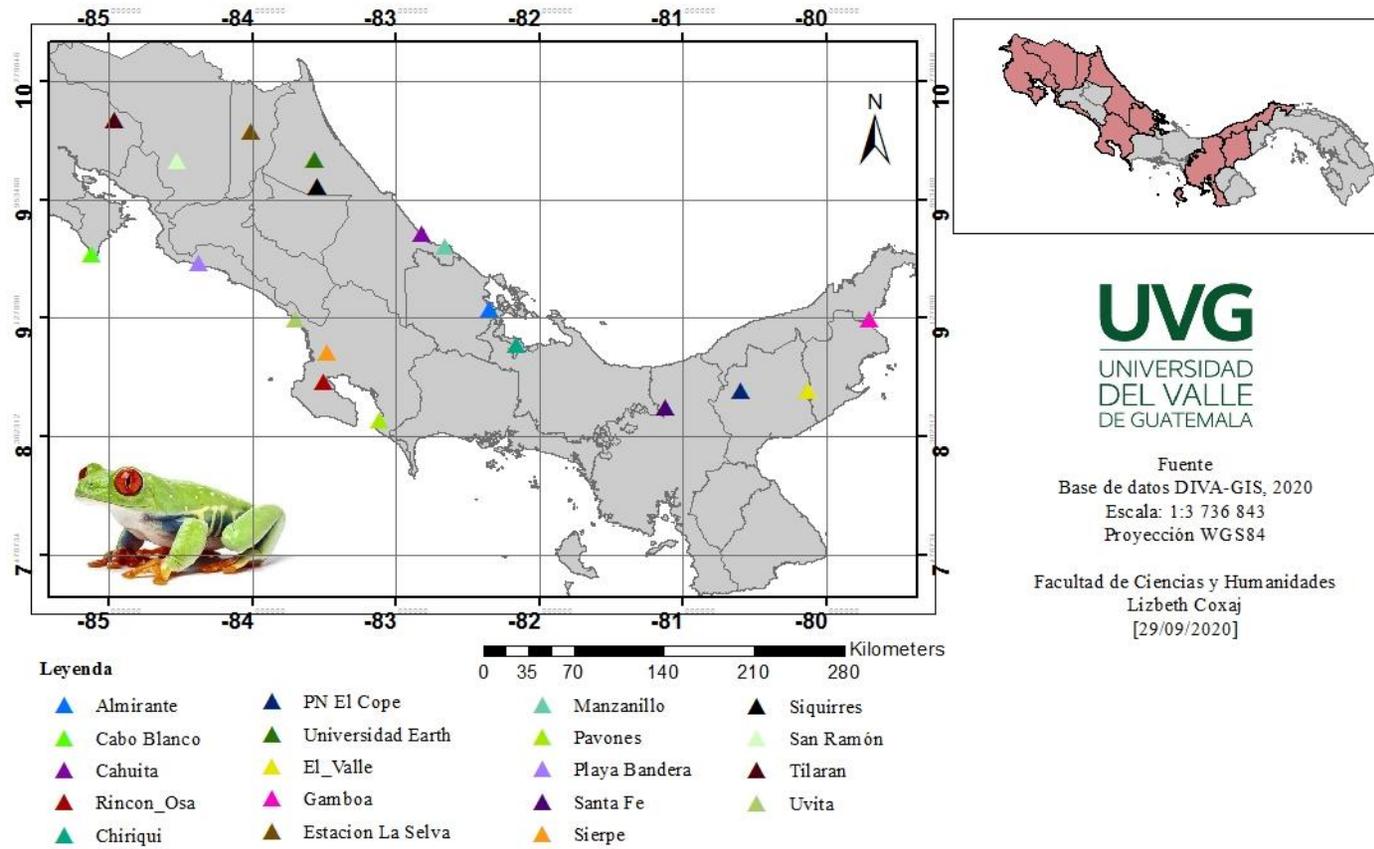
**Figura 6.** Distribución geográfica de las poblaciones de las ranas de ojos negros (Hylidae: *A. moreletii* Duméril, 1853) en Guatemala y El Salvador.

## 2. *Agalychnis callidryas*

Costa Rica se localiza en la parte central o ístmica del Continente Americano. Cuenta con 50,900 km<sup>2</sup> de superficie. Limita al norte con Nicaragua, y al sureste con Panamá, al este entre el mar Caribe y el océano Pacífico al oeste. Posee montañas y valles a lo largo del país, que corren longitudinalmente sobre la parte central, siendo la Cordillera Volcánica del Norte y la Cordillera de Talamanca (Solano y Villalobos, 2000). Entre las cuales se localizan las poblaciones de Uvita, Tilaran, San Ramon, Sierpe, Playa Bandera, Pavones, Manzanillo, Estación La Selva Biológica, Universidad Earth, Rincón de Osa (Campo), Cahuita y Cabo Blanco (Figura 7).

Panamá limita al Norte con el Mar Caribe, al Este con Colombia, al Sur con el Océano Pacífico y al Oeste con Costa Rica. La superficie total de la república es de 75,517 km<sup>2</sup>, los cuales comprenden nueve provincias: Panamá, Colón, Darién, Coclé, Veraguas, Bocas del Toro, Herrera, Los Santos y Chiriquí. En donde el uso de suelo se ha centrado al crecimiento poblacional, a la actividad de la ganadería extensiva y agricultura de subsistencia. Sin embargo, las provincias, como Bocas del Toro cuentan aún con el 67.84% de cobertura boscosa poco intervenida. Darién, con un 75.51% de bosque, en el que se encuentra el parque nacional Darién, así como áreas de producción y de restricciones (FAO, 2020). En esta región de El Salvador se localizan las poblaciones de Santa Fe, Gamboa, El Valle, parque nacional El Cope, Chiriquí y Almirante (Figura 7).

**Distribución geográfica de las poblaciones de la rana de ojos rojos  
(Hylidae: *A. callidryas* Cope, 1862) en Costa Rica y Panamá**



**UVG**  
UNIVERSIDAD  
DEL VALLE  
DE GUATEMALA

Fuente  
Base de datos DIVA-GIS, 2020  
Escala: 1:3 736 843  
Proyección WGS84

Facultad de Ciencias y Humanidades  
Lizbeth Coxaj  
[29/09/2020]

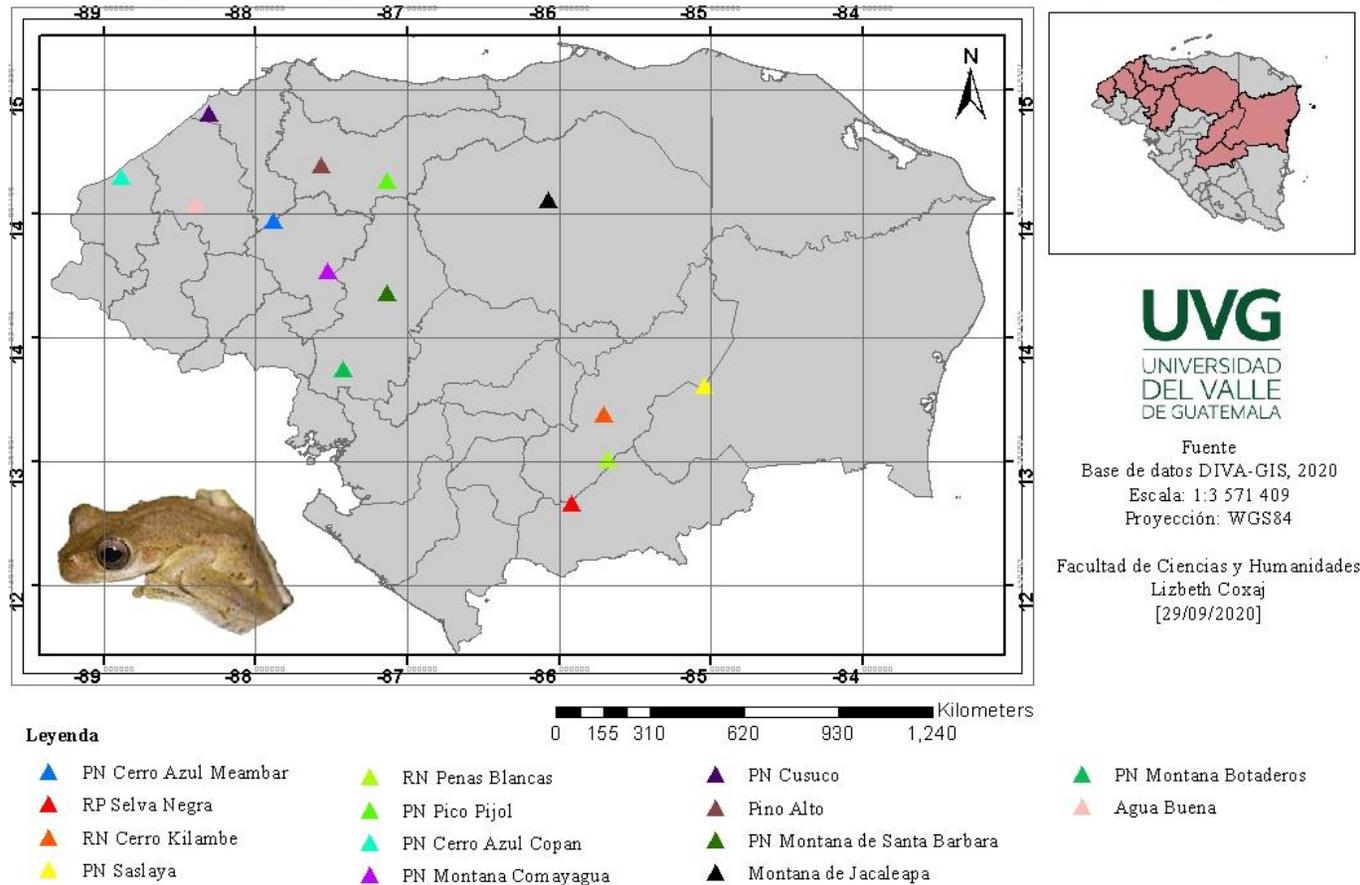
**Figura 7.** Distribución geográfica de las poblaciones de las ranas de ojos rojos (Hylidae: *A. callidryas* Cope, 1862) en Costa Rica y Panamá.

### 3. *Ptychohyla hypomykter*

Honduras limita al norte con el mar Caribe o de las Antillas, al sur con El Salvador, al este con Nicaragua, al sur oeste con El Salvador y al Oeste con Guatemala. Su extensión territorial comprende los 112,492 km<sup>2</sup>. En el cual se extienden montañas con fuertes pendientes y suelos poco profundos recientes. La cordillera Centroamericana atraviesa el país de noroeste a sureste, dividiéndolo en oriental y occidental (FAO, 2020). En esta región se encuentran las poblaciones de Agua Buena, PN Montana Botaderos, PN Montana Santa Bárbara, PN Montana Comayagua, Montana de Jacaleapa, Pino Alto, PN Cusuco, PN Cerro Azul Meambar, PN Cerro Azul Copán y PN Pico Pijol (Figura 8).

Nicaragua limita al norte con Honduras, al este con el Mar Caribe, al sur con Costa Rica y, al oeste con el Océano Pacífico. Su extensión territorial consta de 130,700 km<sup>2</sup>, dividiéndose en tres regiones: pacífica, central y atlántica. La región Pacífica, se constituye con las sierras de Managua, las mesetas de los pueblos, la cordillera de Brito y zonas volcánicas. Además, se caracteriza por ser la más poblada. En cambio, la región central y Atlántica se caracterizan por poseer valles intramontanos (FAO, 2020). En estas regiones se encuentran las poblaciones de RN Penas Blancas, PN Saslaya, RN Cerro Kilambe y RP Selva Negra (Figura 8).

**Distribución geográfica de las poblaciones de la rana de arroyo de Copán  
(Hylidae: *P. hypomykter* McCranie & Wilson, 1993) en Honduras y Nicaragua**



**Figura 8.** Distribución geográfica de las poblaciones de las ranas de ojos rojos (Hylidae: *P. hypomykter* McCranie & Wilson, 1993) en Honduras y Nicaragua.

## B. Procedimientos

El estudio se trabajó con base de datos de secuencias de distintas poblaciones de *A. moreletii*, *A. callidryas* y *P. hypomykter*.

En el caso de *A. moreletii* se obtuvieron un total de 115 secuencias, (Apéndice 1), las cuales fueron proveídas por PhD. Alejandra Zamora, pertenecientes a zonas de Guatemala y El Salvador.

Para la obtención del material genético de *A. moreletii* se llevaron a cabo colectas entre el 2017 – 2018, gestionaron los permisos respectivos de ética y colecta en Guatemala (Apéndice 4 y 5), y El Salvador (Apéndice 6). Las colectas se llevaron a cabo con la metodología de relevamiento por encuentros visuales (Visual Encounter Survey - VES). La muestra de ADN se tomó por medio de hisopado bucal para coleccionar células epiteliales bucales para su posterior extracción.

A su vez mediante las visitas realizadas a las áreas de estudio, se determinó grados de perturbación, de alta a baja, basados en el estado de las pozas. La finca Dulce Rocío, las Nubes, la Gracia, el Naranjo y en Parque los Andes es alta. En donde las pozas son artificiales, y, además, estas se encuentran cercanas a las casas de las fincas sin una conexión cercana a bosques. Para RNP Patrocinio, Reserva natural Tarrales y los Andes se estiman de perturbación media. Aunque las pozas no son naturales existe cierto grado de protección y conexión a bosques. En cambio, en la RP Sac Wach Já la perturbación es baja, ya que la poza es natural y con conexión a bosques.

### 1. Obtención de las secuencias de *A. moreletii*

Para obtener las secuencias, se elaboraron extracciones de ADN utilizando el kit de extracción de *Blood and Tissue* (Qiagen).

Se amplificó el gen mitocondrial citocromo b (*cyt b*) y 16S utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizaron los pares de marcadores 16SA-L/16SB-H (Palumbi, 1991) y MVZ15/MVZ16 (Moritz *et al.*, 1992), los cuales se especifican en el Cuadro 1. Se emplearon en las muestras descritas según el apéndice 1.

**Cuadro 2.** Marcadores seleccionados para amplificar la región mitocondrial Citocromo b y 16S.

Región del gen	Nombre del primer	Secuencia del primer 5' – 3'	Tamaño esperado (bp)	Punto de fusión (Tm°)
Cytb	MVZ15	GAACTAATGGCCACACWWTACGNAA	~385	69.5
	MVZ16	AAATAGGAARTATCAYTCTGGTTTRAT		59.2
16S	16SA – L	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	~1500 – 1800	59.1
	16SB – H	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT		67.6

(Moritz, *et al.*, 1992; Palumbi, *et al.*, 2002; Faivovich *et al.*, 2004)

El master mix se realizó de hasta un volumen final de 20 µl. Se utilizó 9.6 µl de MyTaq™ Red Mix (Bioline), 0.8 µl de cada marcador (10 µM), 6.8 µl de agua de PCR y 2 µl de ADN.

El programa de PCR para amplificar la región 16S consistió en una desnaturalización inicial de 3 min a 95°C, seguido de la desnaturalización del ADN por 30 s a 95°C por 25 ciclos, el alineamiento de los marcadores fue de 30 s a 50°C, la extensión por Taq fue de 20 s por 72°C y una extensión final de 10 min a 72°C. Para el Cyt *b*, el programa consistió en una desnaturalización inicial de 3 min a 95°C, seguido de la desnaturalización del ADN por 30 s a 95°C por 30 ciclos, el alineamiento de los marcadores fue de 30 s a 48°C, la extensión por Taq fue de 30 s por 72°C y una extensión final de 10 min a 72°C.

El ADN se visualizó en geles de agarosa al 1% y se purificó utilizando los kits illustra™ ExoProStar™ (Merck) o ExoSAP-IT™ (ThermoFisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR purificados se enviaron a las instalaciones genómicas de la Universidad de Manchester o a la instalación genómica central de la Universidad de Sheffield.

## 2. Obtención de las secuencias de *A. callidryas* y *P. hypomykter*

En el caso de *A. callidryas* y *P. hypomykter* las secuencias se obtuvieron de la base de datos universal NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>). En *A. callidryas* se adquirieron 76 secuencias correspondientes a zonas de Costa Rica y Panamá (Apéndice 2). De *P. hypomykter* un total de 55 secuencias correspondientes a Nicaragua y Honduras (Apéndice 3).

## 3. Análisis de datos

Se evaluó la calidad de las secuencias utilizando el software MEGA X (Madrigal – Valverde, 2017). Luego, se alinearon utilizando el mismo programa. MEGA X permite ensamblar alineamientos, inferir árboles evolutivos, estimar distancias genéticas y diversidades, probar la selección, entre otros (Kumar *et al.*, 2018).

Se elaboró el grupo de datos de secuencias concatenadas con los genes de 16S y Cyt *b* en *A. moreletii*, utilizando el programa Mesquite versión 3.61. Permitiendo editar, manipular, combinar matrices, entre otros (Mesquite, 2019). En el caso de *A. callidryas* y *P. hypomykter* este proceso no fue elaborado, ya que solo se trabajó con una región del gen (16S). Aunque, en los tres casos, se adicionó una secuencia de *A. annae*, provistas por PhD. Alejandra Zamora, el cual conformó el outgroup,

Con la construcción de estas matrices de datos, se procedió al análisis de su genética poblacional. Se determinó el modelo de sustitución que mejor se adapta a los datos, para ello se utilizó la opción de Mega X, en *Models, Find best DNA/Protein Models (ML)* (Kumar *et al.*, 2018). Obteniendo un modelo para cada especie y gen independiente y uno con las bases de datos concatenadas.

Se determinó la presencia de polimorfismos de ADN, el índice de diferenciación genética, el test de neutralidad (D de Tajima) y la presencia de haplotipos utilizando DnaSP6. Este programa permite analizar extensos análisis de polimorfismos de ADN. Para el cual utiliza una interfaz práctica para el análisis de datos robustos (Rozas, 2009).

Se elaboraron los análisis filogenéticos y redes de haplotipos para conocer la diferenciación genética. Para las filogenias se utilizó MrBayes construyendo los árboles por cada especie y gen de forma independiente. Se construyó con 1000 réplicas y utilizando el modelo de sustitución obtenido para cada gen. Debido a que la selección, fluctuación en

tamaño poblacional, deriva genética y aislamiento afectan las relaciones de los mismos (Florez, 2009; Carrillo, 2014). Este programa permite realizar los análisis filogenéticos de inferencia bayesiana (Ronquist, Huelsenbeck, Teslenko y Nylander, 2019). De esta forma se generaron datos que se visualizaron en FigTree v1.4.4., permitiendo editar y diseñar las filogenias obtenidas (Rambaut, 2007).

Por último, para la obtención de haplotipos se utilizó el programa Popart 1.7. El Cual permite ingresar las secuencias y sintetizarlas a una red para comprender las relaciones evolutivas entre las poblaciones, las frecuencias y distribución de los haplotipos (Leigh y Bryant, 2015).

## VI. RESULTADOS

Se utilizaron un total de 246 secuencias para llevar a cabo los análisis, 115 corresponden a *A. moreletti*, siendo 55 del gen 16S y 60 de Cyt *b*. En el caso de *A. callidryas* se trabajó con 76 secuencias, y 55 de *P. hypomykter* para el gen 16S.

### A. *Agalychnis moreletii*

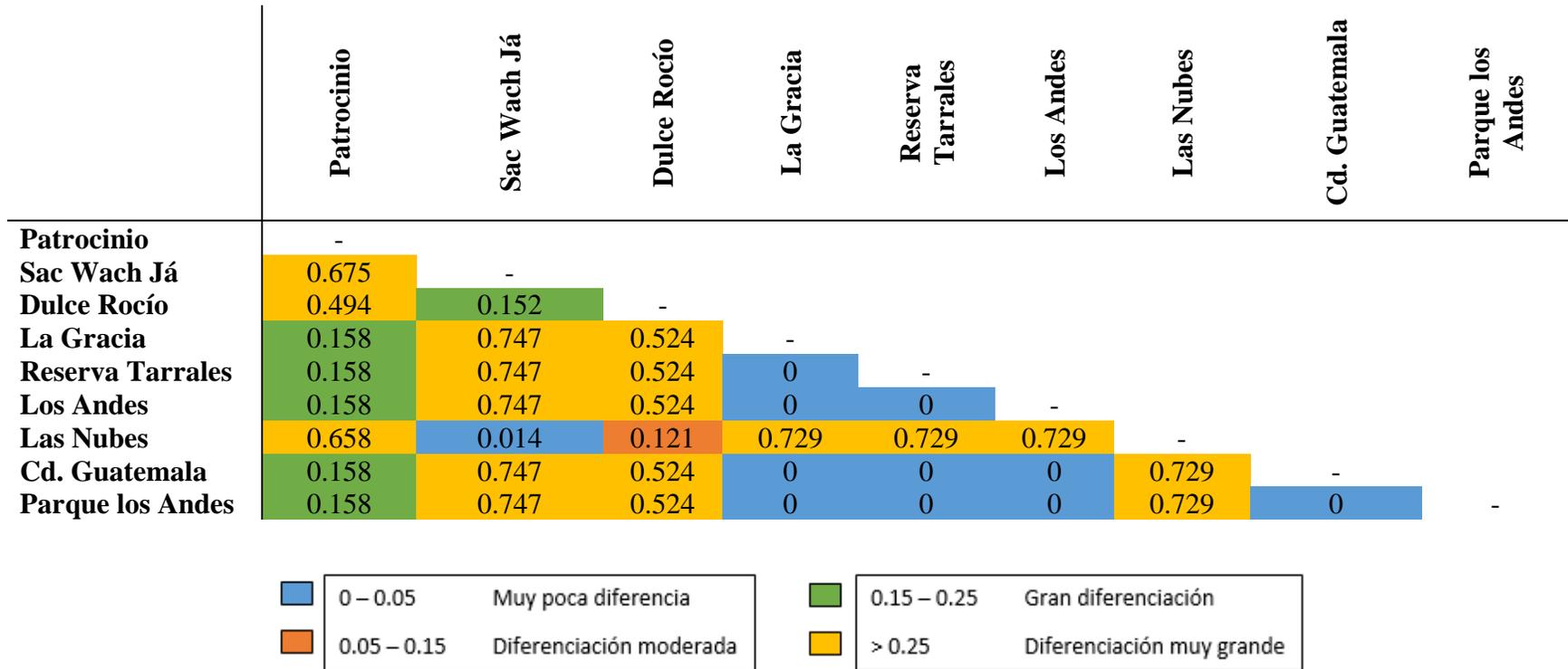
**Cuadro 3.** Análisis genético de poblaciones de Guatemala y El Salvador, a partir de secuencias del gen 16S en *A. moreletii* utilizando el software DnaSP. Representando los sitios polimórficos (S), el número de mutaciones ( $\eta$ ), el número promedio de diferencias nucleotídicas ( $k$ ) y la diversidad de nucleótidos presentes en las distintas zonas ( $\pi$ ). Los valores para El Naranjo – Guatemala y parque Los Andes – El Salvador fueron de cero, debido a la baja diversidad de los sitios.

Área	<i>S</i>	$\eta$	<i>k</i>	$\pi$
<b>RNP Patrocinio, Quetzaltenango (GT)</b>	2	2	0.779	0.00157
<b>RNP Sac Wach Já, Alta Verapaz (GT)</b>	3	3	1.098	0.00212
<b>Finca Dulce Rocío, Zacapa (GT)</b>	7	7	3.000	0.01370
<b>Finca La Gracia, Escuintla (GT)</b>	1	1	0.303	0.00060
<b>Reserva Tarrales, Suchitepéquez (GT)</b>	2	2	0.606	0.00132
<b>Los Andes, Suchitepéquez (GT)</b>	1	1	0.533	0.00104
<b>Las Nubes, Alta Verapaz (GT)</b>	7	7	1.474	0.00301
<b>General</b>	11	11	1.022	0.00487

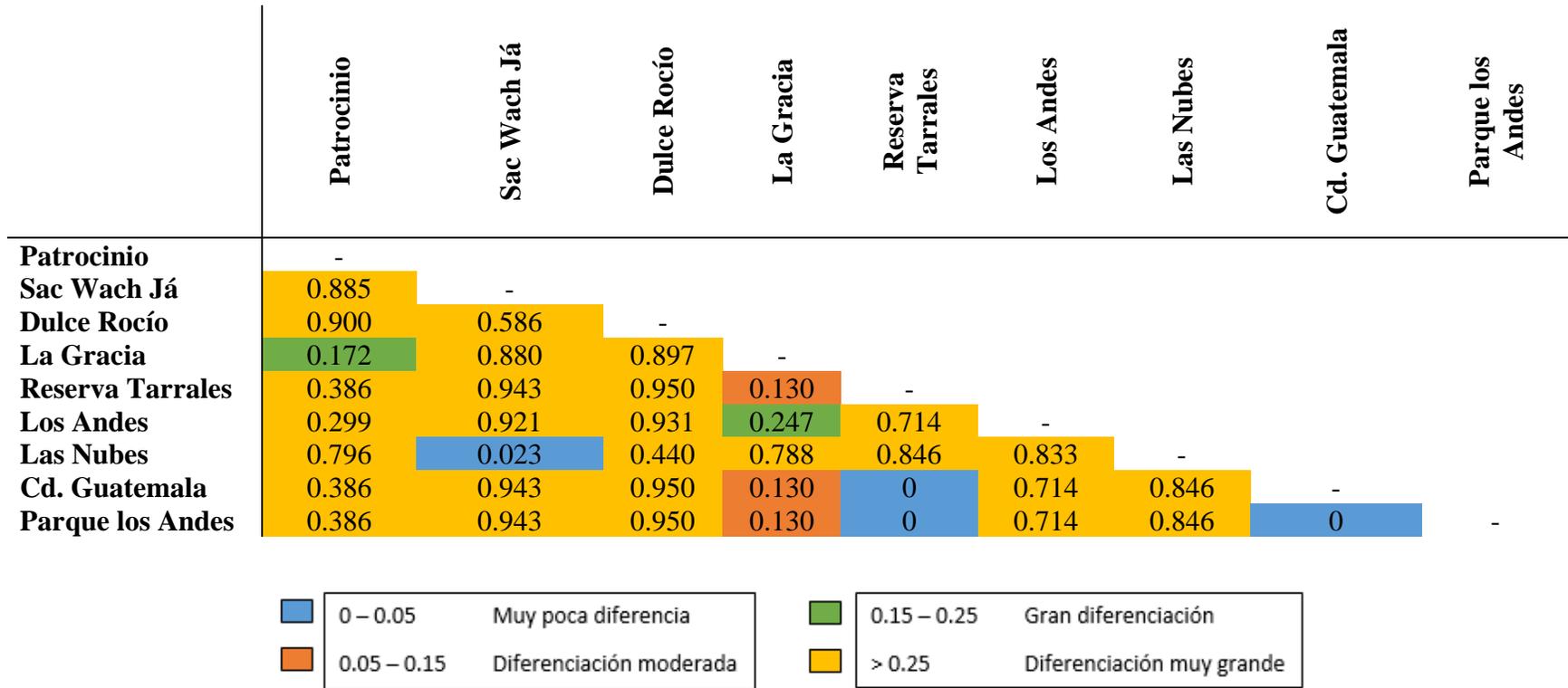
**Cuadro 4.** Análisis genético de poblaciones, a partir de secuencias del gen *cyt b* en *A. moreletii* utilizando el software DnaSP. Representando los sitios polimórficos (*S*), el número de mutaciones ( $\eta$ ), el número promedio de diferencias nucleotídicas (*k*) y la diversidad de nucleótidos presentes en las distintas zonas ( $\pi$ ). Los valores para Reserva natural Tarrales – Suchitepéquez y El Naranjo – Guatemala fueron de cero, debido a la baja diversidad de los sitios.

<b>Área</b>	<b><i>S</i></b>	<b><math>\eta</math></b>	<b><i>k</i></b>	<b><math>\pi</math></b>
<b>RNP Patrocinio, Quetzaltenango (GT)</b>	2	2	1.004	0.00145
<b>RNP Sac Wach Já, Alta Verapaz (GT)</b>	2	2	0.800	0.00131
<b>Finca Dulce Rocío, Zacapa (GT)</b>	5	5	2.143	0.00347
<b>Finca La Gracia, Escuintla (GT)</b>	5	5	1.955	0.00248
<b>Los Andes, Suchitepéquez (GT)</b>	3	3	1.286	0.00164
<b>Las Nubes, Alta Verapaz (GT)</b>	16	16	3.048	0.00492
<b>Parque Los Andes, El Salvador (SV)</b>	1	1	0.442	0.00064
<b>General</b>	18	18	4.098	0.00720

**Cuadro 5.** Índice de diferenciación genética ( $F_{ST}$ ), a partir de secuencias del gen 16S en *A. moreletii* utilizando el software DnaSP.



**Cuadro 6.** Índice de diferenciación genética ( $F_{ST}$ ), a partir de secuencias del gen *Cyt b* en *A. moreletii* utilizando el software DnaSP.

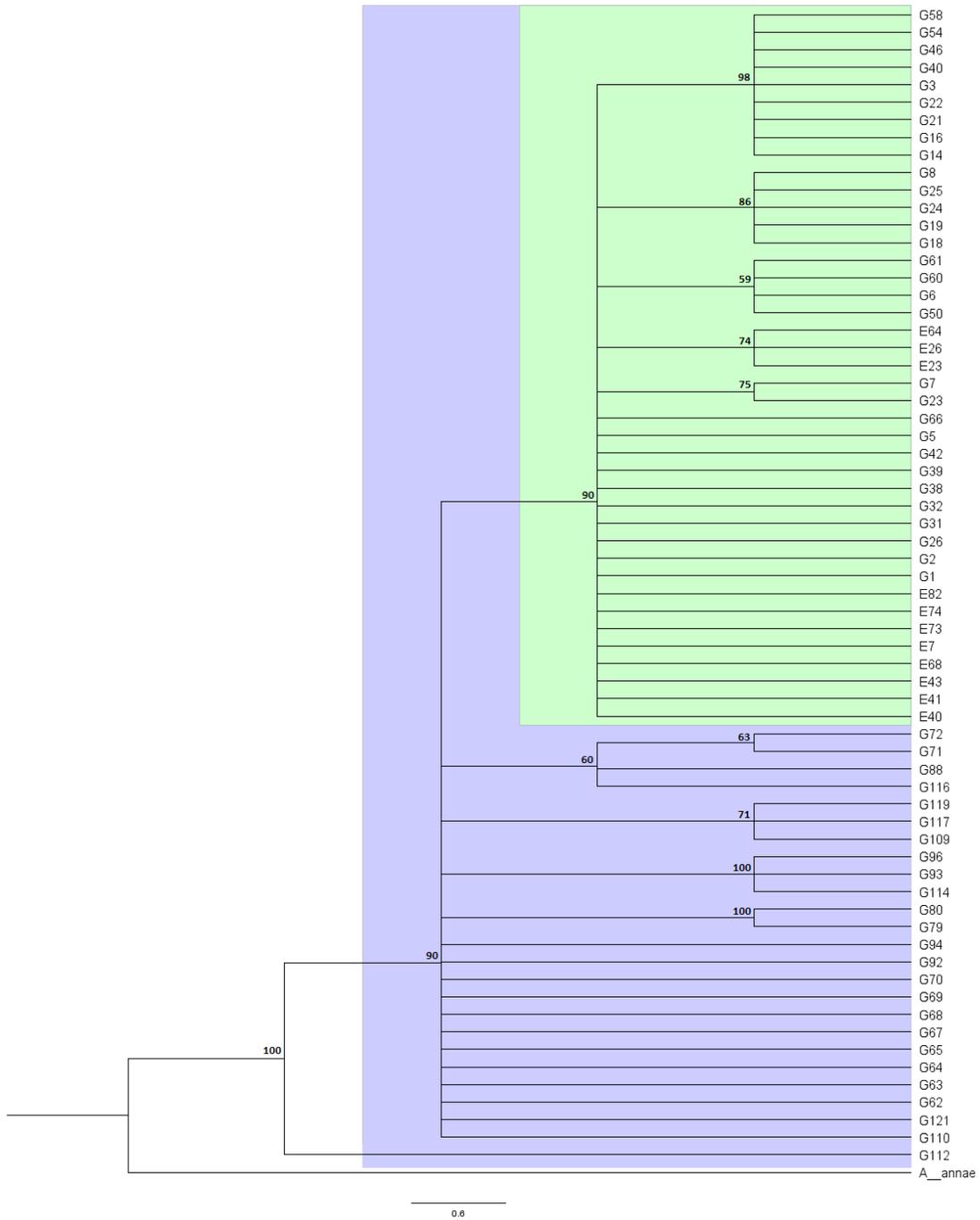


**Cuadro 7.** Test de neutralidad D de Tajima, a partir de secuencias del gen 16S en *A. moreletii* utilizando el software DnaSP. Donde con un valor de  $P > 0.10$  los datos no son significativos en este estudio. Los valores para El Naranjo – Guatemala no se obtuvo por pocas secuencias analizadas; y para Los Andes – El Salvador, no presenta polimorfismos, por lo que no se obtuvieron resultados en esas zonas.

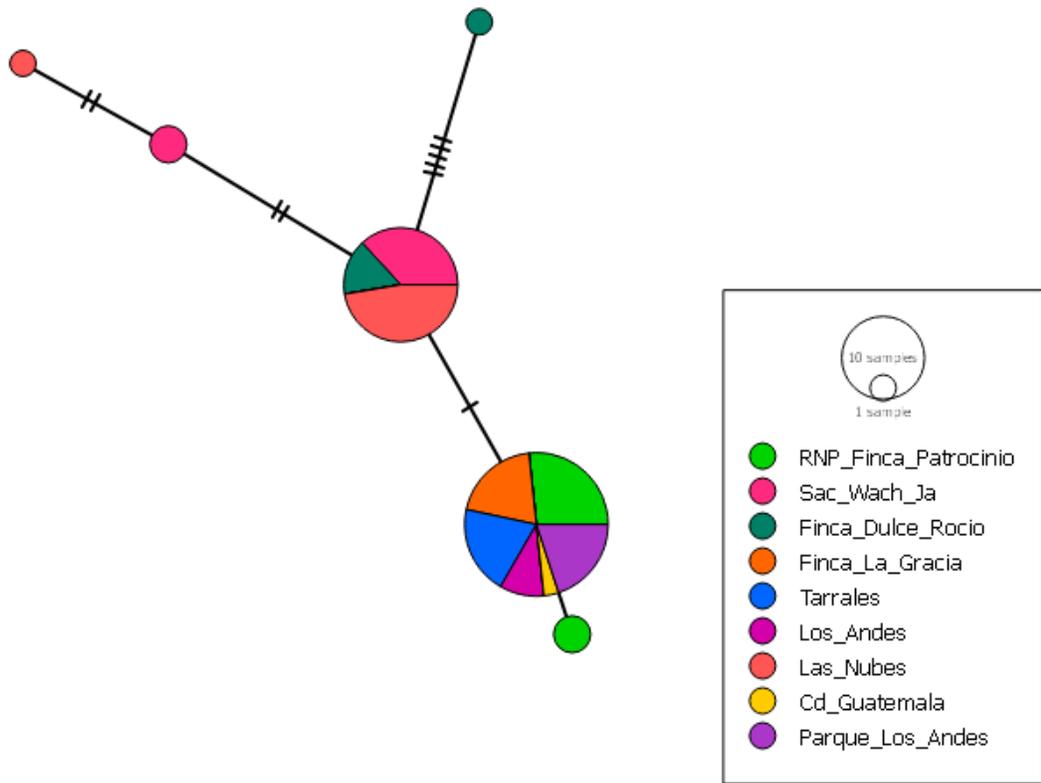
Área	Tajima's D
RNP Patrocinio, Quetzaltenango (GT)	0.89508
RNP Sac Wach Já, Alta Verapaz (GT)	0.71791
Finca Dulce Rocío, Zacapa (GT)	0.52929
Finca La Gracia, Escuintla (GT)	-0.19492
Reserva Tarrales, Suchitepéquez (GT)	-0.24805
Los Andes, Suchitepéquez (GT)	0.85057
Las Nubes, Alta Verapaz (GT)	-0.83219
<b>General</b>	<b>-1.31291</b>

**Cuadro 8.** Test de neutralidad D de Tajima, a partir de secuencias del gen *cytb* en *A. moreletii* utilizando el software DnaSP. Donde con un valor de  $P > 0.10$  los datos no son significativos en este estudio. Los valores para El Naranjo – Guatemala no se obtuvo por pocas secuencias analizadas, y para Reserva natural Tarrales – Suchitepéquez, no presenta polimorfismos, por lo que no se obtuvieron resultados en esas zonas.

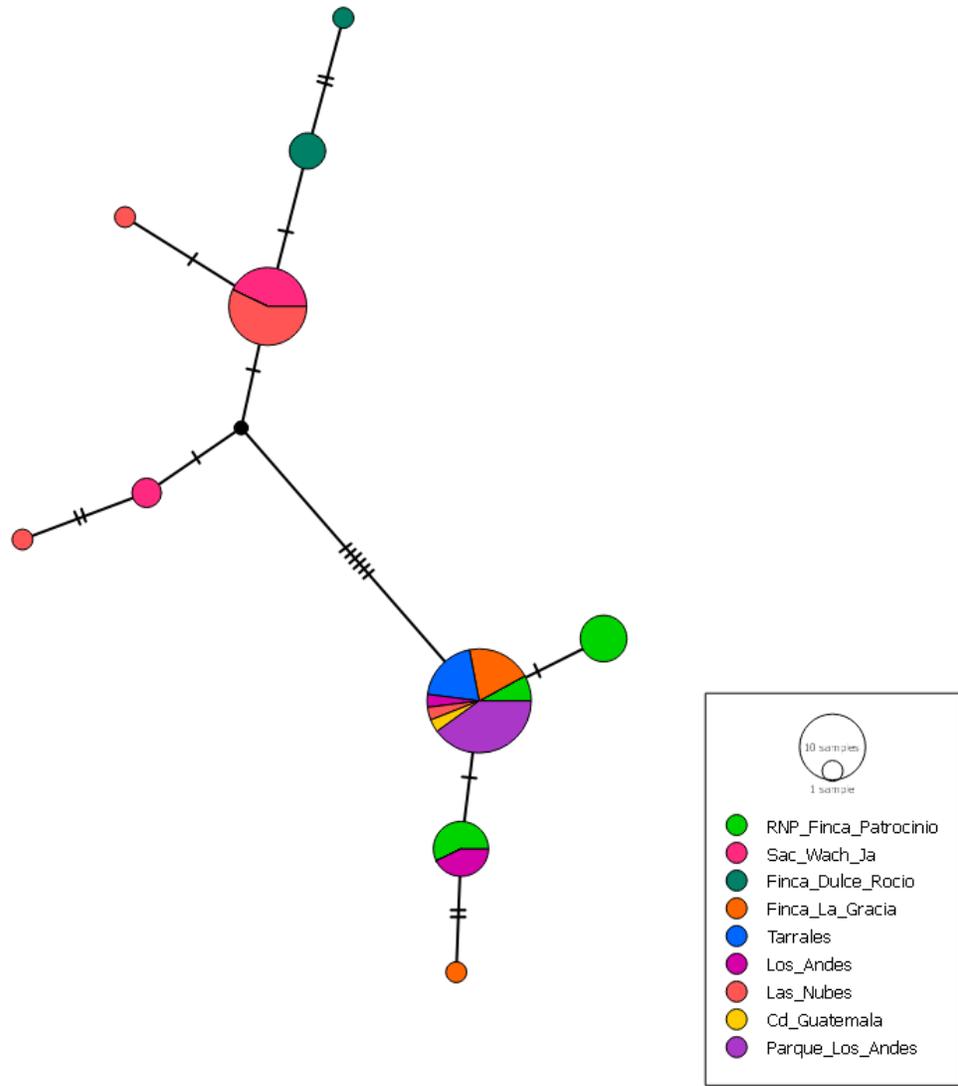
Área	Tajima's D
RNP Patrocinio, Quetzaltenango (GT)	1.88176
RNP Sac Wach Já, Alta Verapaz (GT)	0.83775
Finca Dulce Rocío, Zacapa (GT)	0.50437
Finca La Gracia, Escuintla (GT)	0.66537
Los Andes, Suchitepéquez (GT)	0.45766
Las Nubes, Alta Verapaz (GT)	-1.11024
Los Andes, El Salvador (SV)	1.02588
<b>General</b>	<b>0.61466</b>



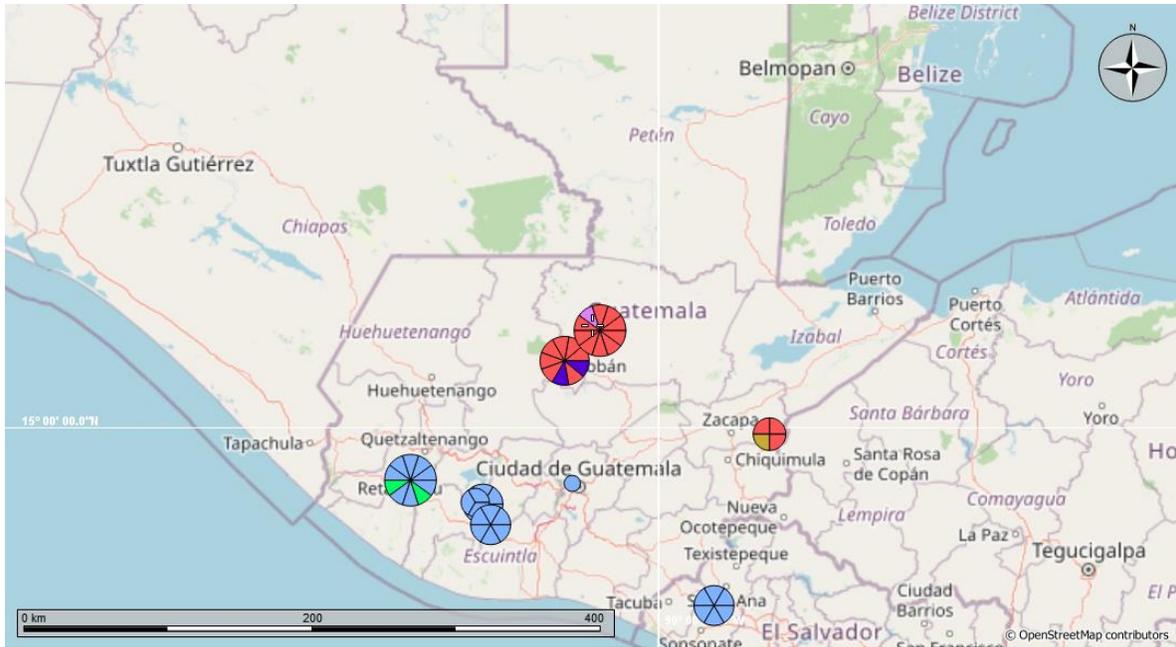
**Figura 9.** Filogenia de las relaciones de *A. moreletii* entre las poblaciones, utilizando alineamientos concatenados de los genes de *Cyt b* y 16S. Construido con 1000 réplicas, con el modelo de sustitución General Time Reversible (GTR) y con el patrón Gamma distribuido con sitios invariantes (G + I). Los números en las ramas indican las probabilidades posteriores. Se muestran dos grupos denominados sur (verde ■) y norte (morado ■).



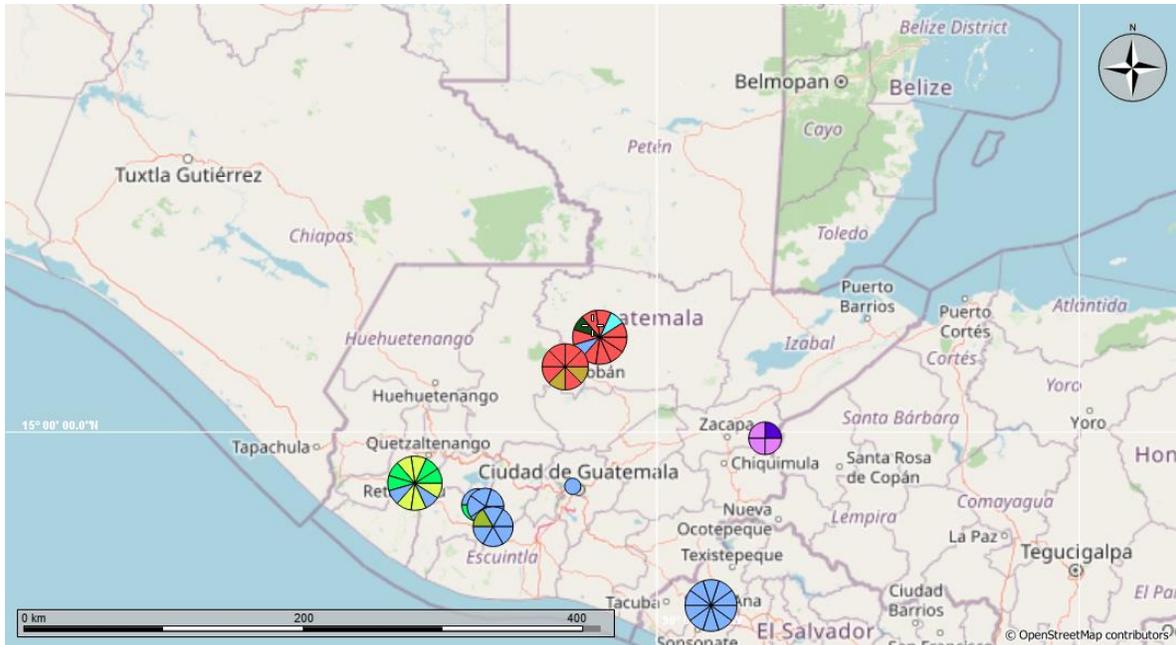
**Figura 10.** Red de haplotipos obtenida a partir de las 55 secuencias de *A. moreletii* del gen 16S en el software Popart. Posee 6 haplotipos representados por medio de círculos con una diversidad de 0.5852, y sitios variables o mutaciones representados con líneas transversales.



**Figura 11.** Red de haplotipos obtenida a partir de las 60 secuencias de *A. moreletii* del gen *Cyt b* en el software Popart. Posee 10 haplotipos representados por medio de círculos con una diversidad de 0.7578, y sitios variables o mutaciones representados con líneas transversales.



**Figura 12.** Frecuencias y distribución de haplotipos de *A. moreletii* del gen 16S obtenida de 9 poblaciones. Se construyó utilizando el software Popart mediante el análisis Median Joining. Los círculos representan a cada población muestreada y se encuentra dividida por la cantidad de organismos por sitio. Por otro lado, de un total de seis haplotipos, los colores representan la cantidad de los mismos presentes en las poblaciones.



**Figura 13.** Frecuencias y distribución de haplotipos de *A. moreletii* del gen *Cyt b* obtenida de 9 poblaciones. Se construyó utilizando el software Popart mediante el análisis Median Joining. Los círculos representan a cada población muestreada y se encuentra dividida por la cantidad de organismos por sitio. Por otro lado, de un total de diez haplotipos, los colores representan la cantidad de los mismos presentes en las poblaciones.

B. *Agalychnis callidryas*

**Cuadro 9.** Análisis genético de poblaciones, a partir de secuencias del gen 16S en *A. callidryas* utilizando el software DnaSP. Representando los sitios polimórficos (S), el número de mutaciones ( $\eta$ ), el número promedio de diferencias nucleotídicas (k) y la diversidad de nucleótidos presentes en las distintas zonas ( $\pi$ ). Los valores para Siquirres – Heredia y Almirante – Bocas del Toro fueron de cero, debido a la baja diversidad de los sitios.

Área	S	$\eta$	k	$\pi$
Uvita, Puntarenas (CR)	82	82	40.833	0.03656
Tilarán, Guanacaste (CR)	7	7	3.733	0.00325
San Ramón, Alajuela (CR)	6	6	4.000	0.00348
Sierpe, Puntarenas (CR)	6	6	2.857	0.00271
Santa Fe, Veraguas (PA)	34	34	22.667	0.001973
Playa Bandera, Puntarenas (CR)	1	14	4.667	0.00412
Pavones, Puntarenas (CR)	4	4	1.714	0.00149
Reserva Cabo Blanco, Puntarenas (CR)	43	43	18.571	0.01616
Manzanillo, Limón (CR)	31	31	9.758	0.00851
Estación La Selva Biológica, Heredia (CR)	12	13	4.121	0.00359
Gamboa, Panamá (PA)	12	12	5.429	0.00479
El Valle, Coclé (PA)	4	4	2.133	0.00186
Universidad Earth, Heredia (CR)	10	10	4.286	0.00373
Parque Nacional El Cope, Coclé (PA)	10	10	4.429	0.00385
Chiriquí, Bocas del Toro (PA)	29	30	11.200	0.00975
Rincón Osa, Puntarenas (CR)	5	5	2.286	0.00199
Cahuita, Limón (CR)	22	22	11.733	0.01021
<b>General</b>	<b>161</b>	<b>169</b>	<b>37.495</b>	<b>0.03623</b>

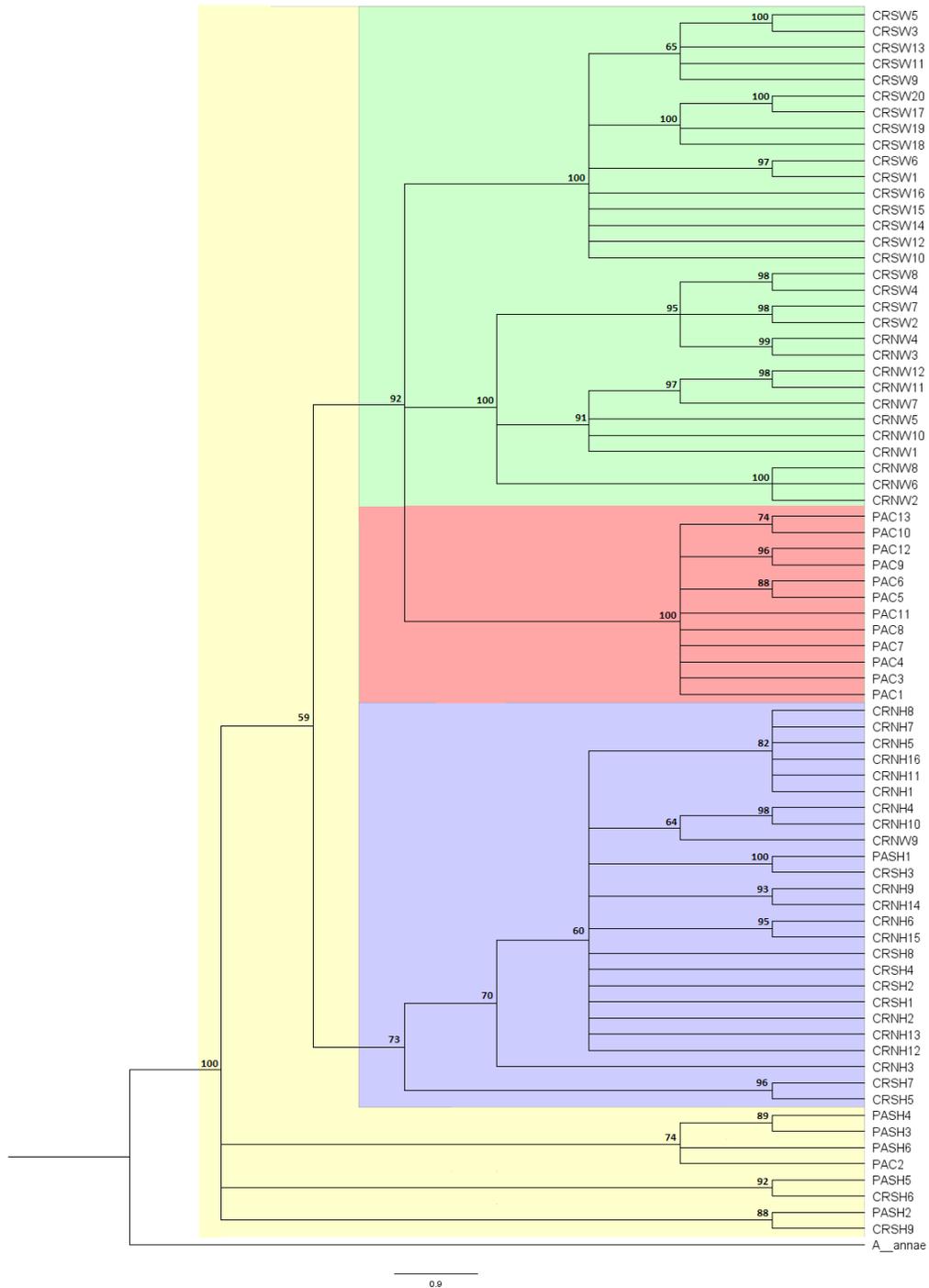
**Cuadro 10.** Índice de diferenciación genética ( $F_{ST}$ ), a partir de secuencias del gen 16S en *A. callidryas* utilizando el software DnaSP.

	Uvita	Tilarán	San Ramón	Siquirres	Sierpe	Santa Fe	Playa Bandera	Pavones	Manzanillo	La Selva Biológica	Gamboa	El Valle	Universidad Earth	El Cope	Chiriquí	Rincón Osa	Cahuíta	Cabo Blanco	Almirante	
<b>Uvita</b>	-																			
<b>Tilarán</b>	0.589	-																		
<b>San Ramón</b>	0.594	0.215	-																	
<b>Siquirres</b>	0.622	0.440	0.524	-																
<b>Sierpe</b>	0.421	0.949	0.952	0.978	-															
<b>Santa Fe</b>	0.417	0.469	0.470	0.535	0.817	-														
<b>Playa Bandera</b>	0.419	0.898	0.903	0.944	0.947	0.683	-													
<b>Pavones</b>	0.432	0.958	0.961	0.987	0.169	0.826	0.955	-												
<b>Manzanillo</b>	0.535	0.115	0.130	0.263	0.908	0.324	0.833	0.917	-											
<b>La Selva Biológica</b>	0.590	0.106	0.046	0.427	0.948	0.455	0.897	0.957	0.109	-										
<b>Gamboa</b>	0.566	0.829	0.838	0.896	0.934	0.289	0.876	0.942	0.740	0.823	-									
<b>El Valle</b>	0.590	0.891	0.898	0.959	0.959	0.308	0.915	0.968	0.798	0.887	0.218	-								
<b>Universidad Earth</b>	0.591	0.109	0.198	0.286	0.945	0.472	0.893	0.954	0.124	0.065	0.823	0.885	-							
<b>El Cope</b>	0.575	0.855	0.86	0.922	0.945	0.289	0.892	0.954	0.763	0.848	0.180	0.164	0.848	-						
<b>Chiriquí</b>	0.527	0.576	0.577	0.671	0.899	0.158	0.818	0.908	0.362	0.567	0.745	0.790	0.573	0.762	-					
<b>Rincón Osa</b>	0.523	0.961	0.964	0.990	0.824	0.841	0.961	0.860	0.921	0.960	0.950	0.974	0.957	0.960	0.915	-				
<b>Cahuíta</b>	0.517	0.220	0.208	0.367	0.896	0.240	0.814	0.905	0.018	0.210	0.715	0.771	0.241	0.739	0.228	0.910	-			
<b>Cabo Blanco</b>	0.316	0.656	0.656	0.714	0.849	0.446	0.196	0.858	0.578	0.652	0.682	0.723	0.656	0.698	0.585	0.867	0.549	-		
<b>Almirante</b>	0.622	0.896	0.905	1	0.978	0.333	0.945	0.987	0.718	0.892	0.913	0.964	0.884	0.934	0.208	0.991	0.610	0.746	-	

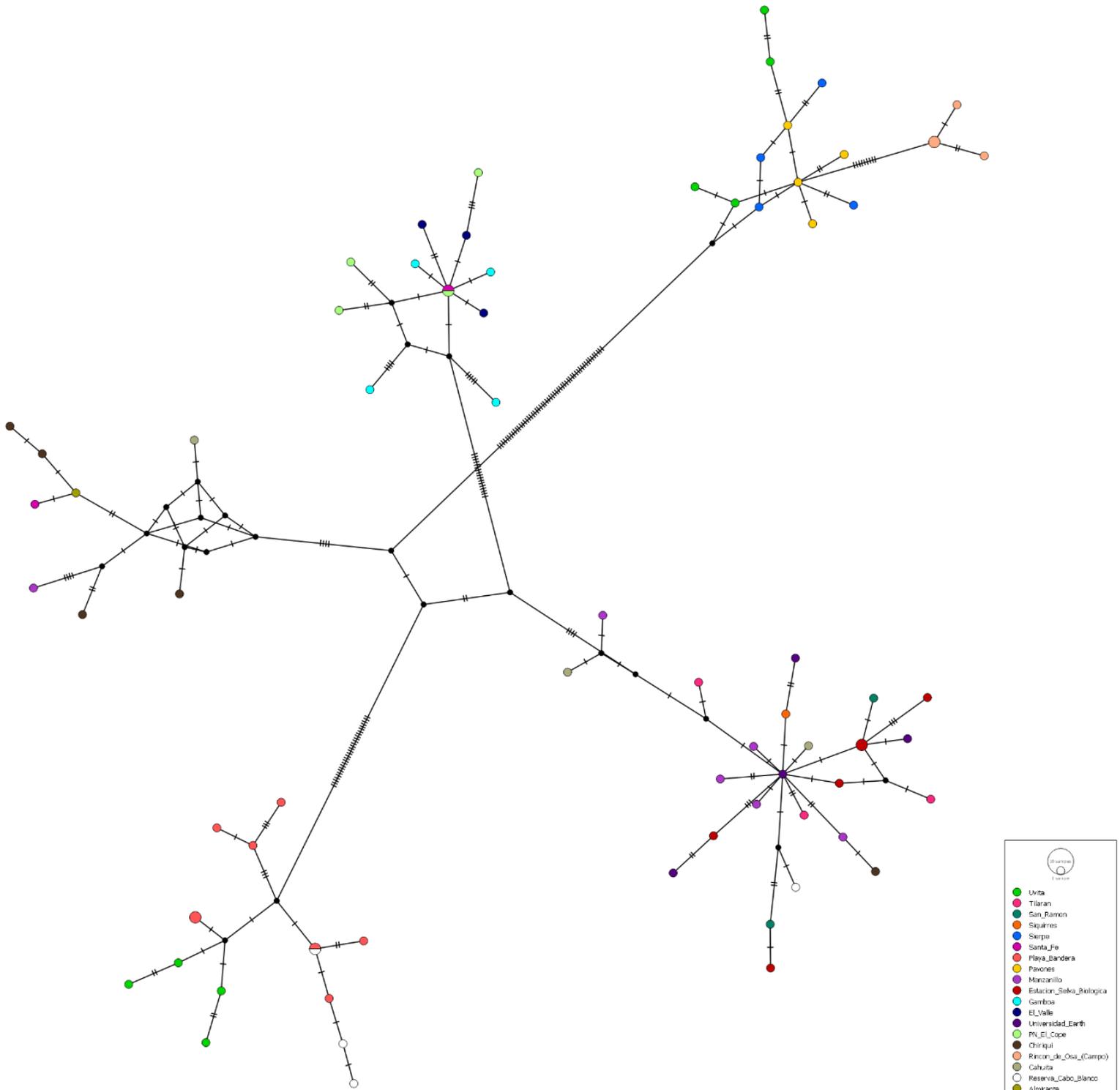


**Cuadro 11.** Test de neutralidad D de Tajima, a partir de secuencias del gen 16S en *A. callidryas* utilizando el software DnaSP. Donde con un valor de  $P > 0.10$  los datos no son significativos en este estudio. Los valores para Siquirres – Heredia y Almirante – Bocas del Toro no se obtuvo por pocas secuencias analizadas.

<b>Área</b>	<b>Tajima's D</b>
<b>Uvita, Puntarenas (CR)</b>	2.80294
<b>Tilarán, Guanacaste (CR)</b>	1.26744
<b>San Ramón, Alajuela (CR)</b>	2.15629
<b>Sierpe, Puntarenas (CR)</b>	1.09401
<b>Santa Fe, Veraguas (PA)</b>	2.30185
<b>Playa Bandera, Puntarenas (CR)</b>	0.41251
<b>Pavones, Puntarenas (CR)</b>	0.48523
<b>Reserva Cabo Blanco, Puntarenas (CR)</b>	0.64239
<b>Manzanillo, Limón (CR)</b>	-0.22287
<b>Estación La Selva Biológica, Heredia (CR)</b>	-0.18066
<b>Gamboa, Panamá (PA)</b>	0.87024
<b>El Valle, Coclé (PA)</b>	1.18059
<b>Universidad Earth, Heredia (CR)</b>	0.55061
<b>Parque Nacional El Cope, Coclé (PA)</b>	0.73397
<b>Chiriquí, Bocas del Toro (PA)</b>	0.26961
<b>Rincón Osa, Puntarenas (CR)</b>	0.84031
<b>Cahuita, Limón (CR)</b>	1.36568
<b>General</b>	0.77922



**Figura 14.** Filogenia de las relaciones de *Agalychnis callidryas* entre las poblaciones, utilizando el gen 16S. Construido con 1000 réplicas, con el modelo de sustitución General Time Reversible (GTR) y con el patrón Gamma (G). Los números en las ramas indican las probabilidades posteriores. Se muestran tres grupos oeste (verde ■), centro (rojo ■) este (morado ■) y combinación (amarillo ■).



**Figura 15.** Red de haplotipos obtenida a partir de las 76 secuencias de *A. callidryas* del gen 16S en el software Popart. Posee 71 haplotipos representados por medio de círculos con una diversidad de 0.9916, y sitios variables o mutaciones representados con líneas transversales

C. *Ptychohyla hypomykter*

**Cuadro 12.** Análisis genético de poblaciones, a partir de secuencias del gen 16S en *P. hypomykter* utilizando el software DnaSP. Representando los sitios polimórficos ( $S$ ), el número de mutaciones ( $\eta$ ), el número promedio de diferencias nucleotídicas ( $k$ ) y la diversidad de nucleótidos presentes en las distintas zonas ( $\pi$ ). Los valores para Agua Buena – Olancho, PN Montana Botaderos – Olancho, PN Montana Comayagua – Comayagua, PN Pico Pijol – Yoro, RN Penas Blancas – Jinotega, y PN Cerro Azul Copán – Copán, fueron de cero, debido a la baja diversidad de los sitios.

Área	$S$	$\eta$	$k$	$\pi$
<b>PN Montana Santa Barbara, Santa Barbara (HN)</b>	1	1	0.667	0.00121
<b>Montana de Jacaleapa, Olancho (HN)</b>	1	1	0.667	0.00121
<b>Pino Alto, PN Pico Pijol (HN)</b>	2	2	0.257	0.00055
<b>PN Cusuco, Cortes (HN)</b>	1	1	0.667	0.00135
<b>PN Cerro Azul Meambar, Cortes (HN)</b>	1	1	0.209	0.00043
<b>PN Saslaya, R.A.A.N. (NI)</b>	1	1	0.429	0.00087
<b>RN Cerro Kilambe, Jinotega (NI)</b>	1	1	0.667	0.00121
<b>RP Selva Negra, Matagalpa (NI)</b>	2	2	0.711	0.00144
<b>General</b>	14	14	1.096	0.00234

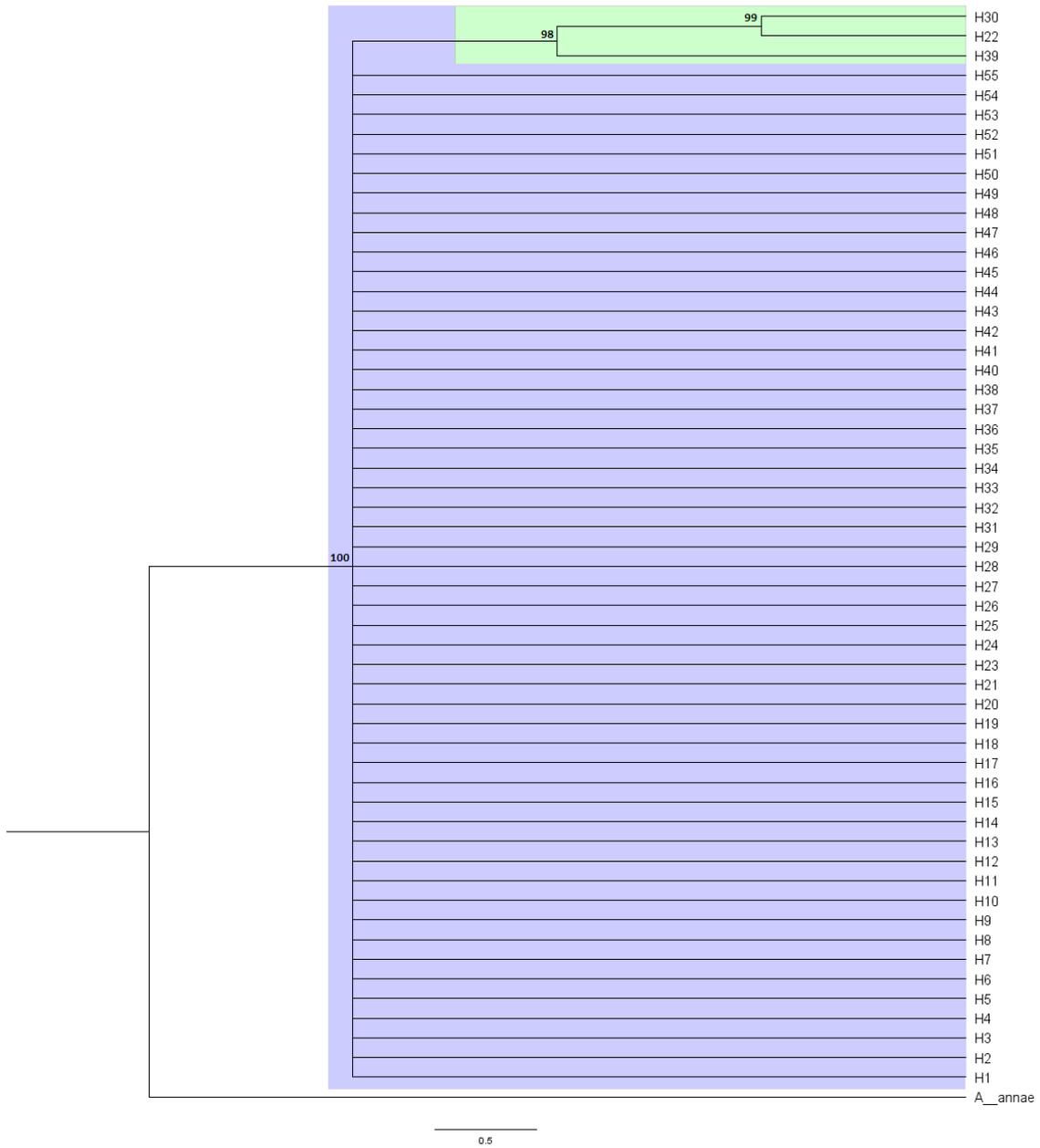
**Cuadro 13.** Índice de diferenciación genética ( $F_{ST}$ ), a partir de secuencias del gen 16S en *P. hypomykter* utilizando el software DnaSP.

	Agua Buena	Botaderos	Jacaleapa	Santa Bárbara	Pino Alto	Cusuco	Comayagua	Meambar	Copán	Pico Pijol	Penas Blancas	Saslaya	Kilambe	Selva Negra
Agua Buena	-													
Botaderos	0	-												
Jacaleapa	0.333	0.333	-											
Santa Bárbara	0.778	0.778	0.667	-										
Pino Alto	0.886	0.886	0.717	0.270	-									
Cusuco	0.926	0.926	0.867	0.833	0.873	-								
Comayagua	1	1	0.778	0.333	0.034	0.905	-							
Meambar	0.829	0.829	0.685	0.249	0.050	0.854	0.059	-						
Copán	1	1	0.905	0.867	0.940	0.778	1	0.906	-					
Pico Pijol	1	1	0.778	0.333	0.034	0.905	0	0.059	1	-				
Penas Blancas	0	0	0.333	0.778	0.886	0.926	1	0.829	1	1	-			
Saslaya	0.143	0.143	0.700	0.687	0.752	0.885	0.829	0.712	0.934	0.829	0.143	-		
Kilambe	0.333	0.333	0.333	0.667	0.717	0.867	0.778	0.685	0.905	0.778	0.333	0.270	-	
Selva Negra	0.111	0.111	0.270	0.699	0.770	0.891	0.852	0.728	0.944	0.852	0.111	0.129	0.270	-

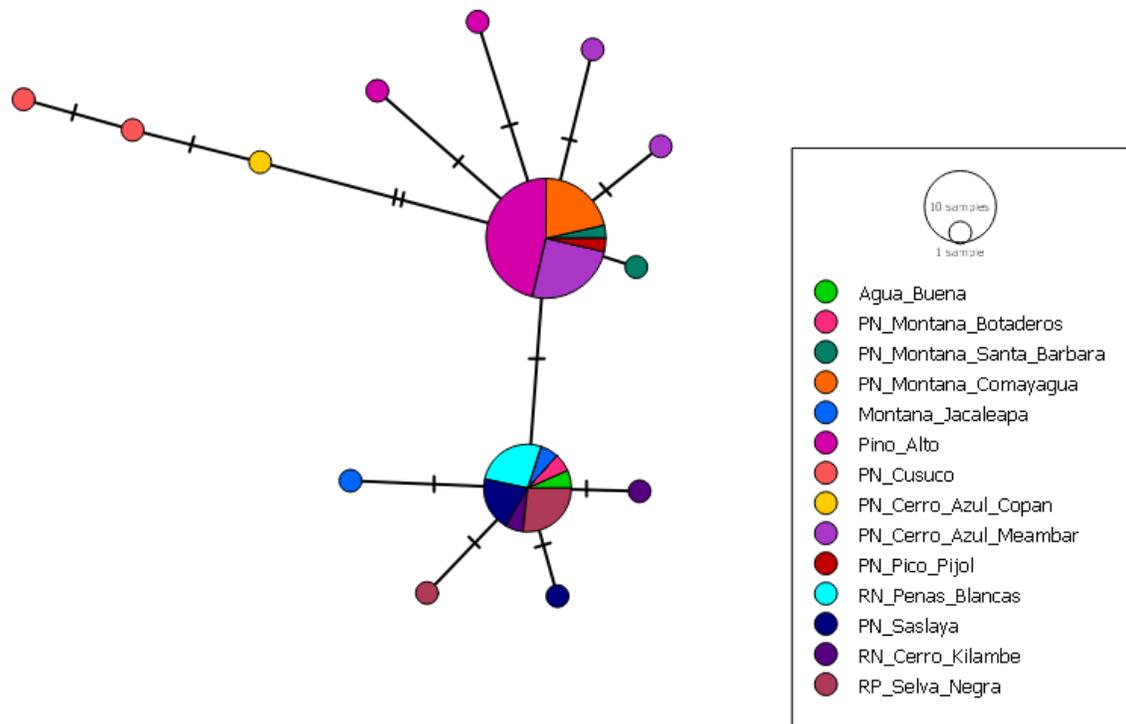


**Cuadro 14.** Test de neutralidad D de Tajima, a partir de secuencias del gen 16S en *P. hypomykter* utilizando el software DnaSP. Donde con un valor de  $P > 0.10$  los datos no son significativos en este estudio. Los valores para Agua Buena – Olancho, PN Montana Botaderos – Olancho, PN Pico Pijol – Yoro y PN Cerro Azul Copán – Copán, no se obtuvo por pocas secuencias analizadas. En cambio, en PN Montana Comayagua – Comayagua y RN Penas Blancas – Jinotega, no presentan polimorfismos, por lo que no se pudo elaborar el análisis en esas zonas.

<b>Área</b>	<b>Tajima's D</b>
<b>PN Montana Santa Barbara, Santa Barbara (HN)</b>	1.63299
<b>Montana de Jacaleapa, Olancho (HN)</b>	1.63299
<b>Pino Alto, PN Pico Pijol (HN)</b>	-1.00369
<b>PN Cusuco, Cortes (HN)</b>	1.63299
<b>PN Cerro Azul Meambar, Cortes (HN)</b>	-0.52899
<b>PN Saslaya, R.A.A.N. (NI)</b>	0.33350
<b>RN Cerro Kilambe, Jinotega (NI)</b>	1.63299
<b>RP Selva Negra, Matagalpa (NI)</b>	0.01889
<b>General</b>	-1.58573



**Figura 16.** Filogenia de las relaciones de *Ptychohyla hypomykter* entre las poblaciones, utilizando el gen 16S. Construido con 1000 réplicas, con el modelo de sustitución General Time Reversible (GTR) y con el patrón Gamma distribuido con sitios invariantes (G + I). Los números en las ramas indican las probabilidades posteriores. Se muestran dos grupos entremezclados por organismos del sur y norte (verde ■ y morado ■).



**Figura 17.** Red de haplotipos obtenida a partir de las 55 secuencias de *P. hypomykter* del gen 16S en el software Popart. Posee 14 haplotipos representados por medio de círculos con una diversidad de 0.6686, y sitios variables o mutaciones representados con líneas transversales.

## VII. DISCUSIÓN

La genética puede ser implementada para comparar poblaciones, dentro y entre ellas (Clark, 2001). Por lo que proporciona información de los cambios evolutivos que han atravesado los organismos. Principalmente porque los factores ambientales por los que atraviesan se ven reflejadas en su estructura genética (Johnston, Keats y Sherman, 2019).

En este estudio se utilizaron dos regiones mitocondriales, 16S y *Cyt b* (Moritz, *et al.*, 1992; Faivovich *et al.*, 2004). Lo que permite relacionar grupos, ya que el ADNm evoluciona rápidamente y es heredado (Avice *et al.*, 1987; Prychitko y Moore, 2000).

### A. Genética poblacional de *A. moreletii*

#### 1. Indicadores de variabilidad genética

Las variables obtenidas de cada población nos ayudan a determinar la diversidad del genoma de la especie. En el caso de ambos genes se puede establecer que existen polimorfismos, los cuales se consideran mutaciones (Montero *et al.*, 2005), y son los que evidencian la variabilidad entre los organismos de una misma especie (Torrades, 2002).

A nivel intra – poblacional evidencian distintos comportamientos en las secuencias y por ende en los genes. Principalmente porque provienen de sitios de alta y baja perturbación.

Para *A. moreletii*, en el gen 16S las poblaciones presentan 11 sitios polimórficos (*S*) (Cuadro 3). En cambio, en *Cyt b*, se identificaron 18 sitios polimórficos (Cuadro 4), y el resto son regiones conservadas. En base a estos resultados, la región *Cyt b*, evidencia más polimorfismos, el cual es apoyado por el valor promedio de diferencias nucleotídicas ( $k$ ); al igual que la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), siendo mayores a los valores generados por el gen 16S. Por tanto, se puede determinar que en estas poblaciones existe variabilidad genética.

Por otro lado, a nivel inter – poblacional, se puede observar más a detalle que poblaciones poseen polimorfismos, y cuales no poseen o evidencian pocos.

En Guatemala, en el gen 16S, siete de ocho sitios poseen polimorfismos (Cuadro 3), siendo las más polimórficas finca Dulce Rocío y Las Nubes. Las cuales se consideran, por sus condiciones, con alta perturbación. También Sac Wach Já, que se considera de baja perturbación, forma parte de las más polimórficas. Principalmente, se debe a que estas poblaciones se encuentren aisladas, por lo que el flujo de genes es limitado, generando alelos privados. Sin embargo, es mucho más diversa y esto evidencia su capacidad de adaptación frente a las perturbaciones en su ambiente. Aunque, puede que estas perturbaciones se presenten en baja frecuencia e impacto, por lo que no afectan en su ADN. A diferencia del

resto de las poblaciones, que representan a la región sur de Guatemala, las cuales poseen pocos polimorfismos. Tal como RNP Patrocinio y La Gracia, que cuentan con un manejo ecológico, y de preocupación por que la especie cuente con sitios de apareamiento; a diferencia de Reserva natural Tarrales y Los Andes. En los cuales, comparten más alelos, evidenciando que su capacidad evolutiva y adaptativa frente a las altas perturbaciones es baja. Por lo que el alto impacto de la actividad humana, con la introducción de monocultivos, ha afectado a las poblaciones. Al igual que en el parque Los Andes – El Salvador, el cual no presentó polimorfismos. Por lo que no se presenta variabilidad en los individuos, siendo idénticos para esta región del gen.

Por tanto, para este gen, la región sur es la menos polimórfica, por lo que los organismos, presentan más sitios conservados, y por ende son más similares. Se cree que esto es causa de los bajos números poblacionales y poco flujo genético entre poblaciones (Vázquez, Castañeda, Garrido y Gutiérrez, 2009). Sin embargo, hay que considerar que al utilizar marcadores mitocondriales únicamente nos permite visualizar eventos del pasado lejano (Vázquez, Castañeda, Garrido y Gutiérrez, 2009); a diferencia de otros marcadores, como los microsatélites. Los cuales podrían identificar perturbaciones más recientes (Ospina *et al*, 2008), por lo que podrían cambiar los valores. Aunque la tendencia apunta a que zonas más perturbadas no presentan mucha diversidad.

En cuanto a Cyt *b*, Guatemala presenta polimorfismos en seis de ocho de las poblaciones, en donde Las Nubes, Dulce Roció y La Gracia son más polimórficas (Cuadro 4). Las Nubes y Dulce Roció, como se mencionó anteriormente, son áreas perturbadas, por lo que este gen ha experimentado variaciones. De esta forma, nuevamente la zona norte es la que presenta más polimorfismos. Por lo que se puede inferir que estas poblaciones se presentan mayor diversidad. En cambio, en la zona sur, mayoritariamente los polimorfismos son bajos, a diferencia de finca La Gracia. El cual, cuenta con un manejo de la finca más ecológico el resto de los sitios. A diferencia del resto de zonas, que al igual que el gen 16S, se ven afectadas por las perturbaciones.

En El Salvador, Los Andes, se encontró un único sitio polimórfico, por lo que existe poca variabilidad en esta población comparada a la de Guatemala. Esta tendencia también es demostrada por los valores establecidos en las diferencias nucleotídicas ( $k$  y  $\pi$ ). Esto evidencia que la capacidad evolutiva de la especie no es buena, al no fijar o generar alelos únicos, a pesar de poseer poco o ninguna oportunidad de flujo genético. Aunque, hay que tomar en cuenta que la cantidad de individuos utilizados no es proporcional. Por ello los valores podrían cambiar si se muestrea el total de la población.

De esta forma, estos resultados sugieren que a nivel intra e inter poblacional, para ambos genes, existen polimorfismos de baja frecuencia. Por lo que estas son afectadas por los factores ambientales, como la pérdida del hábitat. Fungiendo un papel importante en la modificación de las secuencias (Checa, 2007).

## 2. Estructura genética poblacional

La diferenciación genética nos permite realizar comparaciones entre poblaciones para determinar si existe conectividad o flujo genético entre las poblaciones (Wright, 1951). Para ello se emplea el índice de fijación ( $F_{ST}$ ). El cual representa a los valores en cuatro

categorías: 0 – 0.05 (muy poca diferenciación), 0.05 – 0.15 (diferenciación moderada), 0.15 – 0.25 (gran diferenciación) y > 0.25 (diferenciación muy grande) (Wright, 1978).

En el caso del gen 16S, para *A. moreletii*, se identificó que, al comparar las 9 poblaciones, se obtuvo combinaciones, en un 50.0%, con una diferencia muy grande (Cuadro 5). Para el gen 16S Estas relaciones se deben a las comparaciones entre las poblaciones del norte y sur. Separándose por la existencia de las barreras geográficas impidiendo el flujo de genes. La región denominada por el UPIE – MAGA y MAGA – BID (2001) como “tierras altas volcánicas”. El cual, a partir del Terciario superior, aproximadamente, hace 66 ma es probable que se separaran las poblaciones. Sin embargo, la principal barrera es la del Motagua – Polochic – Jocotán, al cual se le atribuyen a la evidencia de separaciones entre vertebrados (Cano, Schuster y Morrone, 2018), debido a que está barrera separa de forma transversal a Guatemala. Generando así los grupos muy distintos, norte y sur.

Por otro lado, aquellas poblaciones que presentan cierta diferenciación en su secuencia corresponden a las comparaciones de las poblaciones entre sur – sur, y norte – norte. En el caso de las zonas del sur estas se ven separadas por las “llanuras costeras del Pacífico” (UPIE – MAGA y MAGA – BID, 2001), que son planicies que se originan del altiplano volcánico en el Cuaternario (2.59 ma). Por lo que Patrocinio es la que presenta más disimilitudes con el resto de poblaciones de la región sur. Ya que las elevaciones no le permiten conectarse con los otros sitios y tener flujo de genes. Además, por sus valores se puede inferir que la separación fue más reciente y por ello no presenta tantas diferencias. Ya que tanto esta barrera como la pérdida de hábitat en esta región afectan a las poblaciones. Originando de esta manera alelos únicos y baja diversidad.

En la zona norte, en cambio, se ve afectada por tres barreras geográficas. Tal como las denominadas “tierras altas sedimentarias” compuesta mayoritariamente por la Cordillera de los Cuchumatanes”, las “tierras altas cristalinas” compuesto por sierras, laderas y montañas, y la “depresión del Motagua”, que son superficies planas o llanuras (UPIE – MAGA y MAGA – BID, 2001). Por lo que Dulce Roció es la población que más difiere con las del norte (Sac Wach Já y Las Nubes), por ello presenta altos niveles de polimorfismo.

En cambio, las zonas más similares mayoritariamente son en la zona sur, debido a que únicamente Sac Wach Já y Las Nubes, de la región norte, presentan cierto grado de similitud. Por lo que estas poblaciones se han separado, probablemente, de forma natural y gradualmente, lo que ayuda a adaptarse mejor, generando diversidad. A diferencia de las poblaciones del sur, en las que se encuentra poca diferenciación genética. Determinando que los individuos son genéticamente iguales, siendo menos diversos.

Estos resultados nos indican que estas poblaciones anteriormente se encontraban conectadas. Pero al aislarse o disminuir el flujo de poblaciones por las “llanuras costeras del Pacífico” (UPIE – MAGA y MAGA – BID, 2001) la barrera afectó la capacidad evolutiva y de adaptación de los organismos. Al ser provocados por el ser humano, debido a la incidencia de los monocultivos, estos eventos son rápidos. Por lo que se pierde la variabilidad en este gen, manteniendo más regiones conservadas.

Para *Cyt b*, el 77.8% de las comparaciones de las poblaciones presenta una diferenciación muy grande (Cuadro 6), presentando disimilitudes entre las poblaciones norte

– sur, norte – norte y sur – sur. Por lo que el flujo de este gen es bajo y su tasa de mutación probablemente es alta generando alelos únicos. Principalmente si comparamos entre poblaciones del sur y del norte. Los cuales, por efecto de las barreras geográficas, la diferencia es marcada ya que el tiempo de separación es mucho más amplio. En cambio, para las comparaciones entre sur – sur, la RNP Patrocinio es la más diferente, debido a que es la que se encuentra más aislada y afronto muchas perturbaciones. Siendo la principal los cambios de manejo de la finca, de una alta a un medio nivel de perturbación. En cambio, los Andes, presentan valores más bajos, pero las acciones humanas han hechos que estas se separen y difieran entre sí; permitiendo poco flujo genético y cambios constantes en su genética. En cambio, al comparar norte – norte, la finca Dulce Roció, también muestra este patrón de amplia separación. El cual es debido a la presencia de tres barreras geográficas y al ser una población aislada y perturbada el flujo genético es poco.

Por otro lado, en el caso de las poblaciones con una diferenciación media se encuentran únicamente poblaciones del sur. Siendo la finca La Gracia la más representativa en esta categoría. Principalmente, se debe a que posea más sitios polimórficos, por lo que su capacidad adaptativa es alta frente a las perturbaciones. Además, puede que esta población ya no se esté afrontando a cambios muy constantes, por lo que ha dado lugar a adaptarse adecuadamente, sin perder su variabilidad.

En cuanto a las poblaciones más similares en la región norte, nuevamente son Sac Wach Já y Las Nubes. Que al igual que el gen 16S es probable que exista un flujo de genes y que las perturbaciones a las que se enfrenta son de baja frecuencia e impacto. En cambio, en la región sur, en algunas poblaciones se presenta altos niveles de similitud. Se le puede atribuir a la frecuencia de perturbaciones, el cual no deja que se fijen los alelos únicos generados por el aislamiento, perdiéndose la variabilidad genética.

### 3. Historia demográfica poblacional

Las barreras geográficas, los factores ambientales y la intervención humana tienen una incidencia directa sobre los organismos y a su vez en las poblaciones (Loo, 2011). Por ello se emplea el test de neutralidad (D de Tajima), el cual mide las diferencias entre las secuencias y establece los eventos por los que han transcurrido (Tajima, 1989). Un valor de cero indica que se ajustan a un modelo neutral estándar. Los valores positivos se originan del exceso de alelos de frecuencia intermedia (pocos alelos raros), los que originan cuellos de botella poblacional, de estructura y / o selección de equilibrio. Por otro lado, los valores negativos indican un exceso de alelos de baja frecuencia (muchos alelos raros) generando expansiones de población y / o selección positiva, derivados de un cuello de botella (Biswas y Akey, 2006).

Para el gen 16S y Cyt *b* a nivel intra e inter poblacional para *A. moreletii* (Cuadro 7 y Cuadro 8), con un  $P > 0.10$  no se obtuvieron valores significativos. Por lo que no se puede establecer con certeza el evento por el que atravesó la población. Únicamente se puede inferir los acontecimientos probables, por lo que se requiere de más datos.

En el caso del gen 16S se podría inferir que todas las poblaciones han experimentado un cuello de botella, unos más recientes que otros (Cuadro 6). En el caso de la RNP Patrocinio, RNP Sac Wach Já, Finca Dulce Roció y Los Andes podría ser un evento reciente. Debido a que presenta pocos alelos raros, y por tanto se podrían haber perdido. Esta tendencia

la demuestra los niveles de polimorfismos, los cuales son bajos. Por lo que, a excepción de Sac Wach Já, las demás poblaciones son áreas perturbadas o que fueron perturbadas. Por lo que su población pudo disminuir, afectando la variabilidad genética (Pierce, 2009). Principalmente porque el área sur, se encuentra en constante perturbación, cabiendo la posibilidad que no se fijen alelos raros. En cambio, debido al manejo de Sac Wach Já, este evento no la afectó drásticamente. Por lo que es probable que haya bajado su variabilidad, pero logró mantener parte de la misma.

En finca La Gracia, Reserva natural Tarrales y las Nubes, existe la probabilidad que al haberse expuesto a este evento generaran alelos distintos a los ancestrales. Se puede apoyar con los valores de  $F_{ST}$  y los niveles de polimorfismo. Indicando que existen frecuencia de alelos raros. Siendo las Nubes, el único sitio, confirmado con microsatélites, que atravesará un cuello de botella (com pers. PhD. Alejandra Zamora) estableciendo alta tasa de variantes en su ADN. Debido a que al ser un lugar aislado podría presentar perturbaciones de baja frecuencia y grado, permitiendo fijar rápidamente nuevos alelos. A causa diferencia de las demás zonas en las que no se perdió diversidad y se fijó pocos alelos raros. Aunque, en Guatemala la población de *A. moreletii* es mucho más diversa; y probablemente el impacto de las perturbaciones es más bajo que las presentes en El Salvador. Principalmente, porque al no presentar polimorfismos en las secuencias del gen 16S indica que no se han fijado alelos raros.

Por otro lado, para el gen *Cyt b*, se podría inferir que la mayoría de la población ha atravesado por un cuello de botella reciente, a excepción de Las Nubes (Cuadro 8). Esto explicaría los bajos valores de polimorfismos presentes en las poblaciones para este gen. En cambio, en las Nubes, a través un cuello de botella (com pers. PhD. Alejandra Zamora), quizás mucho antes que el resto de zonas. Por lo que se encuentra en la expansión de poblaciones, fijando alelos raros, resultados de su interacción con el estímulo.

En ambos casos, la expansión de poblaciones, resultado de los cuellos de botella, se han originado por actividades humanas recientes; y también se le puede atribuir a acontecimientos naturales. En cuanto a las actividades humanas, el cambio de uso de suelo es uno de los muchos factores que afectan a estas especies. Siendo la agricultura limpia anual la predominante en Guatemala (Duro *et al.*, 2005). Y al tener poco o ninguna conexión con otras poblaciones, de esta especie, genéticamente seguirán siendo poco diversas.

#### 4. Análisis de filogenia

Las relaciones entre individuos se construyen a través de árboles filogenéticos los cuales representan conexiones por descendencia común entre especies o grupos taxonómicos (Mendoza – Revilla, 2012).

En el caso de *A. moreletii*, se forman dos clados diferentes los cuales divergieron al mismo tiempo, siendo los grupos categorizados mayoritariamente como: norte y sur (Figura 15). Estos se encuentran unidos mediante un nodo interno, que representa al ancestro común de los organismos (Mendoza – Revilla, 2012).

El G112 de la región norte, de las Nubes, fue el primero en separarse del resto de los individuos. Por lo que algún evento como cuello de botella o bien el efecto de las barreras geográfica causó que alguna mutación la separará de los demás individuos (Iglesias, 2008).

A partir de ahí se diversificaron dos clados, mencionados anteriormente, los cuales por el soporte de las ramas sugiere que su construcción es fiable. Debido a que en las probabilidades posteriores (pp) con un valor mayor a 95 se considera que la construcción del árbol es fiable (Alfaro, Zoller y Lutzoni, 2003).

De esta forma el organismo de las Nubes conserva más de la secuencia ancestral que los demás organismos que cambiaron debido a la incidencia de la barrera de Centroamérica. Además, dentro de los grupos existen diferencias y similitudes los cuales sugieren que en algún momento las poblaciones se encontraban conectadas y por ello pueden estar estrechamente relacionadas.

Por otro lado, las secuencias de El Salvador, se encuentran relacionadas con las poblaciones del sur de Guatemala. Esto sugiere que los individuos se desplazaron desde México y se separaron en Guatemala, por la presencia de la barrera principal, Motagua – Polochic – Jocotán (Cano, Schuster y Morrone, 2018). Esta teoría, podría apoyarse, con la presencia del individuo G61 de las Nubes, perteneciente al lado norte de Guatemala, se encuentra relacionado al clado sur. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que el soporte de su rama es 59, muy por debajo de lo establecido para considerarse fiable. Por lo que se requeriría de la construcción del árbol con más replicas para seleccionar el más parsimonioso; o bien la presencia de este individuo puede hacer referencia a la liberación de especies. Afectando probablemente a que el organismo se desarrolle adecuadamente en su nuevo entorno. Sin embargo, para determinar la incidencia del mismo se requeriría más estudios.

## 5. Modelos de evolución

Genéticamente las poblaciones de organismos experimentan cambios a través de las generaciones. Transmiten sus características, pero con el tiempo la frecuencia de sus alelos en un gen cambia en respuesta a condiciones en su ambiente (Monge – Nájera, 2002).

En el caso de *A. moreletii*, se observó en su filogenia, que estas poblaciones han experimentado cambios en sus alelos. Por ello se construye redes de haplotipos para los genes 16S y *Cyt b*, los cuales nos ayuda a describir las relaciones evolutivas (Vázquez y Col, 2009; Domínguez – Domínguez y Col, 2009).

Para el gen 16S de *A. moreletii* (Figura 16) se observan únicamente 6 haplotipos con una diversidad de 0.5852, a nivel intra poblacional, los cuales han sido heredados a través del tiempo por generaciones. El número de haplotipos indica muy poca variación entre las poblaciones estudiadas y probablemente el tiempo evolutivo ha sido mucho menor (Vázquez, Castañeda, Garrido y Gutiérrez, 2009; Domínguez – Domínguez y Vázquez – Domínguez, 2009). En cuanto a la diversidad haplotípica, determina que hay una diversidad media del gen en la población (Jong, *et al.*, 2011).

De estos haplotipos, se puede establecer que el haplotipo conformado por seis poblaciones es ancestral. Principalmente porque este tipo de haplotipos presenta mayor frecuencia y presenta múltiples conexiones (Vázquez y Col, 2009). Los cuales presentaron mutaciones para originar el resto de las variaciones en los individuos de las zonas, los cuales son haplotipos nuevos. Encontrándose en muy pocas poblaciones, ya que la mayoría (Reserva natural Tarrales, Los Andes, Cd. de Guatemala y Parque Los Andes) solo presentan un haplotipo; evidenciando así la baja variabilidad.

También, se puede observar que para generar un haplotipo de baja frecuencia localizado únicamente en Finca Dulce Roció, esta zona enfrente varias mutaciones. Puede ser probable que este origen sea por los cambios en su ambiente, ya que se considera una zona perturbada, causo un nuevo haplotipo al adaptarse frente al estímulo, como un cuello de botella.

Por otro lado, para el gen *Cyt b* (Figura 17), se observan únicamente 10 haplotipos con una diversidad de 0.8063, a nivel intra poblacional. El número de haplotipos indica muy poca variación entre las poblaciones. Sin embargo, la diversidad haplotípica, determina que hay una diversidad media – alta del gen en la población (Jong, *et al.*, 2011). Por lo que, si comparamos con el otro gen, las probabilidades de obtener más variedad haplotípica es con el de *Cyt b*; ya que esta región de se considera la más polimórfica (Castresana, 2001).

Sin embargo, son pocas las poblaciones que presentan varios haplotipos. Únicamente la ancestral que comprende siete lugares es la que posee la mayoría. En cambio, los nuevos haplotipos se presentan en cuatro de las nueve zonas (RNP Finca Patrocinio, Los Andes, Sac Wach Já, Finca La Gracia, Finca Dulce Roció).

Por lo que la diversidad tanto en El Salvador y Guatemala, para ambos genes, es muy baja. Aunque, si consideramos la presencia de haplotipos en las poblaciones del norte y sur (Figura 15 y Figura 16) la región norte es más diversa. Para el gen 16S presenta cuatro haplotipos mientras que la sur únicamente dos; y para *Cyt b*, la zona norte posee siete haplotipos y la sur cuatro. También se puede observar que la separación por las barreras separó a las poblaciones en dos clados (norte y sur); por ello no se comparten haplotipos, a excepción del ancestral. Por lo que se evidencia que las poblaciones correspondientes al norte de Guatemala, probablemente, la perturbación es de baja incidencia y frecuencia, permitiendo fijar más alelos raros. A diferencia de la región sur que se encuentra en constante perturbación por la incidencia humana. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que muy probablemente no se está tomando el valor real de cada población, por lo que podría haber cambios; pero su tendencia evidencia que *A. moreletii* presenta diversidad genética muy baja, y por ello posee pocos haplotipos.

## B. Genética poblacional de *A. callidryas*

### 1. Indicadores de variabilidad genética

En *A. callidryas* en el gen 16S, la población presenta 161 sitios polimórficos (*S*), poseyendo además 169 mutaciones ( $\eta$ ) (Cuadro 11). Por lo que es la especie que posee mayor variabilidad, en cuanto a los hylidae estudiados. Siendo apoyado por sus valores de *k* y  $\pi$ , los cuales son mayores al resto.

La zona en la que presenta mayor polimorfismo es Costa Rica, en comparación a Panamá, en donde doce de trece poblaciones poseen variabilidad genética. Esto puede atribuirse a la cantidad de información que se obtuvo para cada sitio, siendo mayor para Costa Rica. Por lo que no se presenta un valor real para Panamá, aunque podría inferirse como la tendencia de estas poblaciones.

En el caso de Costa Rica, cuatro poblaciones poseen polimorfismos mayores a 20, siendo la región sur la más polimórfica. Específicamente en Uvita, sus niveles polimórficos son los más altos ya que esta población se encuentra muy aislada de las demás. Por ello

genero más alelos privados, al no tener flujo genético. En cuanto a Cahuita y Manzanillo, son zonas que se encuentran cercanas por lo que podría haber presencia de flujo genético. Sin embargo, al ser unas de las que presentan más polimorfismos puede que el flujo de genes es poco generando alelos únicos para cada población. En cambio, para el resto de las zonas del sur, presenta bajos valores en comparación a las otras poblaciones. Por lo que es probable que estas hayan experimentado eventos que disminuyan su variabilidad de forma continua, evitando que se fijen más alelos raros en cada población.

Por otro lado, la zona norte, únicamente la reserva Cabo Blanco, enfocada a conservación, muestra muchos polimorfismos. Esta población, al encontrarse aislada de otras, la presencia de altos polimorfismos se puede deber a que ha evolucionado independientemente, generando alelos únicos para la misma. Por ello eventos, como la deriva genética, que cambian la variabilidad de los organismos puede que se presenten en baja frecuencia y grado. Permitiendo de esta manera adaptarse y como resultado hay muchas variantes en su ADN. En cambio, para el resto de las poblaciones del norte, presentan poca variabilidad genética en comparación a la de Cabo Blanco. A excepción de Siquirres, en la que no se encontraron polimorfismos; sin embargo, al poseer solo un individuo los datos no son reales.

Los resultados anteriores se le pueden atribuir a la conciencia ambiental que han adquirido Costa Rica desde 1995 (Mejía y Rojas, 2017). Siendo probable que esta diversidad se haya mantenido o disminuido en baja frecuencia desde entonces. En cambio, en Panamá, las poblaciones presentan menos polimorfismos, dos de cinco poblaciones presentan polimorfismos mayores a 20. Siendo Santa Fe y Chiriquí las que lo tienen. Esto ya que se encuentran cercanas a barreras geográficas naturales e implementadas por el ser humano (poblados). Por lo que han generado más alelos únicos frente a los cambios en su ambiente. A pesar de ello, la población de Almirante, que se encuentra cercana a Chiriquí no presentó polimorfismo. Por lo que esta población al encontrarse más al norte no tiene la disponibilidad de flujo genético; y puede que se haya enfrentado a grados de perturbación más frecuentes por lo que se perdieron los polimorfismos y no logró fijar nuevos.

Por tanto, en base a los resultados obtenidos, probablemente *A. callidryas* presente mucho más polimorfismo debido a las barreras geográficas. Las cuales permitieron que generaran más alelos privados. Por lo que, si continua de esta manera es probable que la especie tienda a la especiación alopátrica (Sáez, 2009). Se ha evidenciado cierta diferenciación en la especie en base a sus características morfológicas. Las cuales dependiendo de la región en que se encuentren varían sus patrones de coloración (Duellman, 1970; Villa, 1972; Leenders, 2001; Savage, 2002).

## 2. Estructura genética poblacional

Para *A. callidryas* al comparar las 19 poblaciones, se obtuvo en un 86.0% una diferencia muy grande entre las poblaciones (Cuadro 10). Por lo que la mayoría de las poblaciones son muy diferentes entre sí. Nuevamente se debe a las barreras biogeográficas y probablemente a la distribución ancestral de la especie. En primer lugar, las barreras principales que separan las poblaciones son la Cordillera de Talamanca, la Cordillera Central, las montañas de Tilarán y la Cordillera Guanacaste (Robertson y Zamudio, 2009). Estas separan la región norte, sur de Costa Rica y Panamá; aunque también afecta en la separación

entre poblaciones del norte – norte y sur – sur. Por lo que, desde el origen de las barreras, en el Cuaternario, hace 2.58 ma (Alfaro *et al.*, 2018), lograron que estas poblaciones se diferenciaron. Sin embargo, es probable que el principal motivo sea la distribución de la especie. Puesto que, al distribuirse desde el sur de Veracruz y norte de Oaxaca, México hasta Panamá (IUCN SSC Amphibian Specialist Group, 2020), la separación de las poblaciones ocurrió desde ese punto; ya que las barreras ocurrieron al mismo tiempo que las que separan a *A. moreletii*.

A pesar de ello, no se le puede atribuir únicamente la diferenciación genética a estas causas. Ya que en el caso de Gamboa esta se vio afectada por la barrera geográfica introducida por el ser humano, el canal de Panamá. El cual desde su construcción en 1881 modifico (Autoridad del Canal de Panamá, 2019) y aisló a la población. Por lo que presenta entre gran diferenciación y diferenciación muy grande con el resto de las poblaciones.

Por otro lado, las combinaciones con una diferencia media se refieren a algunas de las comparaciones entre poblaciones de la misma región, es decir sur – sur y norte – norte. En este caso hace referencia a poblaciones que se encuentran cercanas. Sin embargo, al estar divididas por la presencia de la Cordillera de Talamanca se diferenciaron. Por lo que existe la probabilidad que no haya flujo genético y las similitudes se deben a las regiones conservadas y a la baja presencia de polimorfismos.

Por último, aún se encuentran poblaciones denominadas con muy poca diferencia. Entre las que destacan San Ramón y La Selva Biológica; y Manzanillo y Cahuita. En ambos casos, puede que el flujo de genes exista o bien los polimorfismos son menos en comparación a las regiones conservadas.

### 3. Historia demográfica poblacional

Para el gen 16S de *A. callidryas*, con un  $P > 0.10$  no se obtuvieron valores significativos, a excepción de Uvita en Costa Rica, y Santa Fe en Panamá, el cual con un  $P < 0.05$  los valores son significativos.

En el caso de estos dos sitios, ambas evidencian cuello de botella (Cuadro 11), por lo que han atravesado por una disminución de su población. Sin embargo, como se ha observado en el Cuadro 9, si hay varios sitios polimórficos. Por lo que sea probable que, aunque haya disminuido la población no afecto mucho la diversidad genética de esta especie en este gen. Principalmente, se le puede atribuir a que Costa Rica ha cambiado su visión a uno más de conciencia ecológica, por lo que la preservación de los individuos en vida silvestre sea más factible. Aunque, la evidencia del cuello de botella, determina que si ha visto perturbación. Puede atribuírsele a factores humanos nuevamente como el cambio de uso de suelo o bien a un factor natural y a la vez inducido por el ser humano. Tal como la quitridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*), el cual se ha evidenciado en Costa Rica y Panamá. Inclusive en las demás regiones es probable que el cuello de botella también sea responsable por este hecho. Debido a que se ha identificado la presencia de este hongo en Costa Rica en la provincia de Guanacaste en especies de *Craugastor ranoides* (Zumbado, 2009); y en Panamá se ha evidenciado en la región de Darién (Dicyt, 2019). Por tanto, a nivel general esta especie ha atravesado por un cuello de botella tanto en Panamá como en Costa Rica, sin embargo, parece que no se ha visto muy afectada, al poseer 161 sitios polimórficos.

#### 4. Análisis de filogenia

En *A. callidryas* se observan cuatro clados, la región oeste conformado por poblaciones de Sur y Norte de Costa Rica, la Este formado Sur y Norte de Costa Rica y algunas poblaciones de Panamá, central conformado únicamente por poblaciones de Panamá, y la combinación conformada por individuos del Este de Costa Rica y Panamá, y el centro de Panamá (Figura 17). En este caso ocho individuos provenientes de las poblaciones de Cahuita (CRSH9), Manzanillo (CRSH6), Almirante (PASH6), Chiriquí (PASH2, PASH3, PASH4, PASH5) y Santa Fe (PAC2), conservan regiones de su ancestro. A partir de ahí, se diversifican dando origen a nuevos alelos, y por acción de las barreras geográficas, forman los tres clados del Este, Oeste y centro. Sin embargo, debido a que el valor de soporte de su rama es de 59 esta división no es muy clara. Aunque esto se le puede atribuir a que la construcción del clado Este, el cual es poco fiable a comparación de la Oeste. Sin embargo, se evidencia que si existen diferencia entre las localizaciones de las regiones. Además, se puede evidenciar que los individuos procedentes del centro de Panamá son más similares a la región Oeste de Panamá, aunque se diversificaron al mismo tiempo.

#### 5. Modelos de evolución

Se determinó que para *A. callidryas* se presentan 71 haplotipos con una diversidad de 0.9916, a nivel intra poblacional (Figura 15). Por lo que el número de haplotipos indica una variación alta entre las poblaciones (Jong, *et al.*, 2011). Por lo que las probabilidades de obtener un haplotipo diferente por especie son muy altas. En este caso, por lo menos, las poblaciones presentan más de un haplotipo. Por lo que la variabilidad de esta especie es alta, teniendo mucha más diversidad que la de los Hylidae en este estudio. Quizás más en Costa Rica que en Panamá, por la cantidad de zonas utilizadas. Aunque es muy probable que para obtener esta cantidad de haplotipos la especie paso por varios eventos de mutaciones en su ADN. Ya que, para generar, por ejemplo, un conjunto de haplotipos paso por más de 50 mutaciones. Además de que no se diferencia cual es el haplotipo ancestral ya que todos se encuentran en baja frecuencia. Siendo muy probable que el ancestral haya disminuido en las poblaciones debido a los nuevos haplotipos. Por lo que las poblaciones pueden diferir mucho entre ellas, tal como mostro los valores de  $F_{ST}$ .

### C. Genética poblacional de *P. hypomykter*

#### 1. Indicadores de variabilidad genética

Para *P. hypomykter*, a nivel intra – poblacional el gen 16S (Cuadro 12), posee 14 sitios polimórficos. Por lo que si existen variabilidad en la genética de esta especie. Además, comparando con *A. moreletii* posee más variabilidad con la misma cantidad de individuos. Siendo Honduras la región con mayor presencia de polimorfismos.

Sin embargo, si lo vemos inter – poblacionalmente la presencia de polimorfismos es muy baja. Dado que probablemente han enfrentado perturbaciones de alto impacto y frecuencia, por lo que se ha perdido la variabilidad y fija pocos alelos privados. Y al tener poco o nada de intercambio genético su diversidad genética se ve afectada. Inclusive se establece que tanto para la región norte y sur de ambos países la variabilidad es baja. Esto a pesar de que las poblaciones, en ambos países, provienen, en su mayoría, de reservas naturales. Se podría inferir, que la probabilidad de que no se esté dando un buen manejo a las zonas. Pero, es más probable que la cantidad de organismos para cada población es muy baja,

por lo que los valores no son los reales y están sujetos a cambios. Aunque se puede estimar que, al ser una especie vulnerable, no presente muchos polimorfismos.

De esta forma, si comparamos a otros organismos, por ejemplo, con una especie de preocupación menor como *Batrachyla leptopus* (Anura: Leptodactylidae), con el marcador mitocondrial D-loop, se identificó 62 sitios polimórficos en 107 organismos (Esparza, 2015). Debido a los pocos estudios en Hylidae, estos organismos no pertenecen a la misma familia para hacer una comparativa más fiable. Pero se puede ver representado como esta especie no posee tanta variabilidad, a diferencia de *A. callidryas*. Por lo que un evento de perturbación de alto impacto podría afectar a la comunidad de ranas, llevándolo a una reducción de su población (Torrades, 2002).

## 2. Estructura genética poblacional

En *P. hypomykter* al comparar las 14 poblaciones, se obtuvo combinaciones en un 78.2% con una diferencia muy grande (Cuadro 13). Por lo que en su mayoría al comparar las poblaciones presentan diferencias en su ADN. Nuevamente estos patrones se deben a las barreras geográficas, por la Cordillera Centroamérica, la cordillera Isabelia, Chontaleña y Dariense, la sierra Madre y la prolongación de los Andes (SICA, 2020). Además, al haber varias barreras, también se encuentra diferencias dentro de las poblaciones del norte y del sur.

En cambio, las poblaciones que son más similares, algunas correspondientes a la región sur, como Agua Buena y PN Montana Botaderos; aunque la mayoría de similitudes son las poblaciones entre norte y sur. Por lo que es probable que estas zonas se encuentren cercanas a la región central por lo que podría haber flujo de genes. También, es probable porque estas poblaciones no presentaron polimorfismos. Por lo que los individuos son genéticamente similares.

De esta forma, aunque se originaron a partir de una población ancestral, acciones humanas y ambientales las separaron. También, es probable que esta especie, y los otros Hylidos en este estudio, se haya visto afectada por el evento de extinción que ocurrió a finales del Terciario, con el cierre del istmo de Panamá, el cual originó eventos de glaciaciones (Gual y Colino, 2011). Haciendo que estos eventos separaran el flujo de especies y aislará las poblaciones. Así como las acciones de la revolución industrial, las cuales han modificado el clima haciendo que las especies migren y se separen cada vez más (Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático, 2002). Por lo que la mayoría de poblaciones se encuentran en diferenciación muy grande.

## 3. Historia demográfica poblacional

Para esta especie, con un  $P > 0.10$  no se obtuvieron valores significativos. Por lo que no se puede establecer con certeza que evento ha atravesado. Sin embargo, las poblaciones podrían haber pasado por un cuello de botella reciente (Cuadro 13). A excepción de Pino Alto y PN Cerro Azul Meambar, en Honduras, las cuales ahora experimentan expansión de poblaciones.

A pesar de que la mayoría de poblaciones se encuentran en parques naturales o bien reservas privadas han experimentado perturbación que afectó su diversidad. Principalmente porque los polimorfismos evidenciados fueron muy bajos. Por tanto, se podría inferir que en

estos dos países no se le está dando un uso adecuado al medio ambiente. Aunque también se le puede atribuir que parte de estos eventos se puede deber, nuevamente, a la presencia del hongo quitridio, detectado en varias especies de Hylidae en Honduras (Vásquez, 2011).

#### 4. Análisis de filogenia

En este caso no existen clados divididos como *A. moreletii* y *A. callidryas* (Figura 16). Únicamente nos indica que el 94.5% de las poblaciones empleadas de Honduras y Nicaragua están emparentados. Por ello presentó bajos polimorfismos, siendo más similares que *A. moreletii*. Esto, además, evidencia la baja tasa de mutación de la especie, generando así poca diversidad, ya que no fijan ni generan alelos únicos, manteniendo más la región conservada. Aunque se observa que tres individuos, que pertenecen a Honduras, en PN Cusuco (H30, H22) y PN Cerro Azul de Copán (H39) se separaron del resto de individuos. Por lo que se podría inferir que hay variantes en su genoma. Aunque hay que tomar en cuenta que para algunos sitios se formó a la población con muy pocos individuos. Por lo que estos datos podrían cambiar; sin embargo, se observa que la tendencia para esta especie es este modelo. Ya que al ser una especie catalogada por la IUCN SSC Amphibian Specialist Group (2020) como vulnerable, es muy probable que esta especie no posea mucha variabilidad.

#### 5. Modelos de evolución

Por último, en *P. hypomykter* presentó 14 haplotipos con una diversidad de 0.5051, a nivel intra poblacional (Figura 17). Por lo que el número de haplotipos indica una variación media entre las poblaciones (Jong, *et al.*, 2011). De esta forma la cantidad de haplotipos se concentra más en algunas poblaciones. Principalmente como se evidenció en el árbol filogenético, no hay variaciones y al no haber flujo genético las poblaciones no pueden compartir alelos. Obteniendo así el ancestral conformado por cinco poblaciones el cual origino nuevos haplotipos y a su vez, probablemente, un haplotipo nuevo ancestral, el cual comprende seis de las 14 poblaciones estudiadas. Las cuales se dividieron según la región norte (de seis poblaciones) y sur (de cinco poblaciones). Sin embargo, no experimentaron tantas mutaciones como los haplotipos de *A. callidryas*. Por lo que es probable que la capacidad de mutación de esta especie sea baja, lo que la hace vulnerable a cambios drásticos en su ambiente.

#### D. Recomendaciones para la conservación de Hylidae en Centroamérica

La rana de ojos negros, *A. moreletii*, es una especie catalogada como preocupación menor según la IUCN SSC Amphibian Specialist Group (2017) Sin embargo, estos resultados no están apoyados de estudios genéticos de las poblaciones de la especie. Por ello, es necesario elaborar análisis de genética de poblaciones para determinar las tendencias de las poblaciones frente a eventos que puedan disminuir las poblaciones.

Según los resultados obtenidos en este estudio, se establece que las poblaciones han transcurrido por eventos que disminuyeron su variabilidad; por lo que la mayoría de los organismos son similares. Al ser poblaciones pequeñas las hace más vulnerable a eventos de extinción (Kretzmann, *et al.*, 1997). Principalmente porque las poblaciones utilizadas se encuentran en pozas artificiales y lugares perturbados. Además, esta especie al caracterizarse por su reproducción en estanques los esfuerzos de conservación puede centrarse en esta línea.

Principalmente, se puede dirigir los esfuerzos de conservación de las poblaciones en aquellas que presenten más variabilidad haplotípica. Dando prioridad a las poblaciones más diversas: Las Nubes y RNP Finca Patrocinio, para los genes 16S y Cyt *b* (Figura 15 y Figura 16). Las cuales cuentan en el gen 16S con dos haplotipos cada uno; y en Cyt *b* con 6 y 3 haplotipos respectivamente. Siendo estas áreas caracterizadas por cambiar a un manejo más ecológico y conservacionista. Además, se podría conservar las otras zonas que también son diversas, en ambos genes, tales como Finca Dulce Rocío y RNP Sac Wach Já. Esto en cuanto a priorizar poblaciones, sin embargo, lo ideal sería priorizar las poblaciones catalogadas como Unidad Evolutivamente Significativa (UES).

La Unidad Evolutivamente Significativa (UES) es importante conservar debido a que representa a aquellas poblaciones o población que se encuentran aisladas reproductivamente de otras (Waples, 1995). Siendo un elemento importante para la evolución de la especie. Principalmente porque presentan una alta tasa de sustitución nucleotídica, una herencia clonal matrilineal y la ausencia de recombinación (Avice, 1994).

En el caso de este estudio, para *A. moreletii*, según la Figura 12, para el gen 16S, las UES a considerar son RNP Patrocinio en el sur, y en el norte la RNP Sac Wach Já. Principalmente se debe a que la variabilidad de haplotipos presentes difiere más. Para Patrocinio, aunque en su mayoría es similar a las otras poblaciones posee un haplotipo diferente. Al igual que Sac Wach Já, el cual presenta más frecuencia del haplotipo distinto. Sin embargo, se puede seleccionar las demás poblaciones del norte, ya que también presentan haplotipos no compartidos.

Por otro lado, nuevamente para *A. moreletii*, en base a la Figura 13, para el gen *cyt b* las UES de norte y sur a seleccionar serían finca Dulce Rocío y RNP Patrocinio respectivamente. Nuevamente Patrocinio presenta variedad y frecuencia de haplotipos no compartidos. Por lo que lo hace el candidato ideal para conservar. Ahora, en el caso de la zona norte varía la población. Principalmente porque podría seleccionarse cualquiera de las tres ya que presentan haplotipos diferentes. Sin embargo, Dulce Rocío es la única que no comparte ningún haplotipo. Por lo que ha ido evolucionando sus alelos muy distintamente a las demás poblaciones. Debido a estos resultados, en ambos genes, es importante realizar un estudio más afondo con un valor cercano al total de la población para ampliar la información. Priorizando así y logrando implementar estrategias de conservación para las UES y aquellos con alta variabilidad.

Por ejemplo, la época seca es la etapa en la que, los anuros, son más vulnerables, ya que las fuentes de agua son más limitadas, afectando a su fase acuática y terrestre (Reques, 2012). En el caso de las pozas artificiales, es indispensable que se conserven; ya que son fuentes de agua que preservan el agua. Sin embargo, hay que tomar en cuenta el estado de la poza, debido a que si se encuentra dañada no permanecerá el agua. Esto provocaría que las especies se desplacen, ya que generalmente se encuentran ubicadas alrededor de 200 – 300 m de las zonas de reproducción (Reques, 2012). Por otro lado, para las fuentes de agua naturales no sería recomendable perturbarlas y mucho menos a su entorno con la introducción de pozas de materiales artificiales. Se podría implementar varias metodologías, tales como la construcción de charcas y la colocación de tubos PVC o bambú (Reques, 2012; Glorioso y Waddle, 2014). Para las charcas, se podría implementar en áreas muy amplias. El perfil más

adecuado para la especie se puede elaborar tras un estudio de la profundidad, superficie, pendientes adecuados; así como la presencia de macrófitos acuáticos (Reques, 2012). Para los refugios, utilizando tubos, se han implementado en Puerto Rico y Estados Unidos, capturando, en un 82%, ranas de hylidae. Por lo que la implementación en estas zonas puede ayudar en su conservación (Glorioso y Waddle, 2014). Aunque, por las variedades en su largo, ancho y lugar de colocación, es importante elaborar un estudio para determinar el modelo adecuado para la especie. Esto además ayudaría entre la conectividad de poblaciones y a la reproducción de otras especies.

Luego de su implementación, si es un lugar abierto al público es importante concientizar a las personas. Esto por medio de carteles informativos que expongan la importancia de la conservación en los organismos. Así como, advertir que no se encuentra permitido molestar ni alterar su hábitat (Reques, 2012).

También, es necesario realizar un estudio más amplio en Guatemala para determinar cuántas poblaciones se encuentran y en qué estado se encuentran. La información que brindará ayudará a seleccionar la metodología a implementar para conservar a la especie y que poblaciones. Además, ayudará a determinar qué tan separadas se encuentran las comunidades para volver a recuperar la conectividad. Se puede realizar a través de la herramienta de Sistemas de Información Geográfica (SIG). En el cual se puede localizar las poblaciones y las fuentes de agua disponibles, y determinar las distancias (Reques, 2012). Además, es importante que luego de las implementaciones de distintos métodos para conservar, se continúe monitoreando a la especie. De esta forma se podrá obtener datos para observar cómo ha ido progresando la especie.

## VIII. CONCLUSIONES

Los resultados para este estudio sugieren que las poblaciones de *Agalychnis moreletii* en el gen 16S y *Cyt b*, y para *Ptychohyala hypomykter* en el gen 16S poseen una baja diversidad de ADN. Presentando, respectivamente entre 11, 18 y 14 zonas polimórficas a nivel intra – poblacional. En cambio, otra especie de Hylidae, como lo es *Agalychnis callidryas* presento 161 sitios polimórficos. Sin embargo, los altos polimorfismos evidenciados en esta especie sugieren que de continuar así se genere especiación alopátrica. Por lo que, en estas poblaciones, la existencia en su baja diversidad se deriva de la pérdida de conectividad entre estas poblaciones. Y en este caso la alta variabilidad indica que las poblaciones se están aislando generando alelos privados para ciertas poblaciones.

Por ello se dividen en clados, los cuales se generan debido a la presencia de las barreras geográficas, tales como la depresión del Valle del Motagua, la cadena volcánica, la Cordillera de los Cuchumatanes, la llanura costera del pacífico en Guatemala y El Salvador (UPIE – MAGA y MAGA – BID, 2001). La Cordillera Centroamericana, la cordillera Isabelia, Chontaleña y Dariense, la sierra Madre y la prolongación de los Andes en Honduras y Nicaragua (SICA, 2020). Y la Cordillera de Talamanca, la Cordillera Central, las montañas de Tilarán y la Cordillera Guanacaste en Costa Rica y Panamá (Robertson y Zamudio, 2009).

Sin embargo, estos eventos no son la única causa de la pérdida del flujo genético, ya que principalmente la incidencia humana ha provocado mucha fragmentación y destrucción de hábitat, lo que a su vez causa declives poblacionales. A pesar de que los valores no hayan sido significativos con un  $P > 0.10$  la tendencia apunta a esta teoría. A diferencia de las Nubes en Guatemala que mediante microsátélites se estableció que atravesó por este evento (com pers. PhD. Alejandra Zamora). En cambio, en Uvita de Costa Rica y Santa Fe de Panamá, en este estudio, con  $P$  significativo  $< 0.05$ , estas poblaciones experimentaron un cuello de botella. De esta forma los poblados, el cambio de uso de suelo, el establecimiento de los monocultivos y la construcción del canal de Panamá disminuyeron el flujo genético de las especies.

Tal como lo demuestra la filogenia, en el cual se evidencia grupos categorizados mayoritariamente como sur, norte para *A. moreletii*; y este, oeste y central para *A. callidryas*. En cambio, para *P. hypomykter* no se establecen clados ya que la mayoría de los individuos poseen pocos polimorfismos, que muy probablemente no afecten en esta región del gen y por ello no se diversifican en clados.

Estos eventos, además, se evidencian en la red de haplotipos, los cuales determinaron la diversidad y separación que se encuentran en las poblaciones estudiadas.

Para *A. moreletii*, en el caso del gen 16S y Cyt b, se encontró poca variación entre las poblaciones. Principalmente porque el número de haplotipos fue bajo (6 y 10 respectivamente), el cual se debe a su capacidad evolutiva frente a eventos de deriva genética. Además, la diversidad haplotípica, establece que no hay tanta variación en el gen, por tanto, los organismos poseen baja diversidad y tasa de mutación. Por otra parte, para *A. callidryas*, es la especie de Hylidae que presenta más polimorfismos. El cual es apoyado por su diversidad haplotípica, al ser alta. En cambio, en *P. hypomykter*, presenta más polimorfismos que *A. moreletii*; sin embargo, estas son específicas para las poblaciones, en algunos casos, y no se comparte la mayoría como en *A. moreletii*.

Por tanto, en base a los resultados obtenidos, los esfuerzos para la conservación se centrarían en mejorar la conectividad entre poblaciones y disminuir los riesgos que presenta la época seca. Principalmente, porque se evidencia la tendencia, al menos para los lugares de estudio de Guatemala y El Salvador, que lugares más perturbados no fijan alelos y por ende se pierde la variabilidad. Por ello para *A. moreletii*, en base a las UES la conservación se centraría principalmente en finca Dulce Rocío. Que a pesar de ser un área altamente perturbado la capacidad evolutiva y de adaptación de los organismos ha ayudado a mantener cierta diversidad, y diferencia haplotípica. Al igual que en RNP Sac Wach Já y las Nubes, al ser poblaciones con baja perturbación se buscaría aumentar el flujo de genes para mejorar la diversidad de las poblaciones. Así como la RNP Finca Patrocinio, el cual a pesar de ser de la región del sur que se considera la más perturbada. En esta zona se le está dando un manejo más ecológico y conservacionista. El cual ha permitido una diversidad un poco más alta y con diferencia haplotípica.

## IX. RECOMENDACIONES

Para estudios de este tipo es importante que se elabore con el total de la población o al menos un número cercano. De esta forma se obtienen datos más representativos de las poblaciones utilizadas. También, para que los datos sean más completos es importante apoyar los resultados con un estudio ecológico. De esta forma se puede relacionar y evaluar la exposición del organismo frente a su hábitat. Estudiando así la calidad del agua de la zona, los organismos vegetales y animales con los que se relaciona; y ver cómo afecta directa o indirectamente al organismo. Por lo que se puede catalogar a las zonas en las que se encuentra su grado de perturbación más certero.

También, para ampliar la información del estudio molecular se pueden utilizar más marcadores moleculares mitocondriales. Se recomienda utilizar los marcadores descritos por Palumbi, *et al.* (2002) y Faivovich *et al.* (2004). Además, se pueden diseñar marcadores específicos para esta especie. De esta forma se podría obtener más información del gen mitocondrial de las especies. Además, se podría apoyar y aumentar la información obtenida con la utilización de marcadores moleculares de tipo microsatélites. Los cuales brindan información más reciente de las especies estudiadas, a diferencia de los mitocondriales que ven eventos pasados. Además, porque mediante estos marcadores se pueden implementar para calcular el tamaño efectivo de una población (FAO, 2017). Determinando así hacia qué dirección se dirigirían los esfuerzos de conservación desde un punto genético

A su vez, los esfuerzos de conservación se pueden ampliar en Guatemala si se trabaja junto a CONAP. Debido a los decomisos realizados por parte de esta institución, se podría determinar el acervo genético de la especie en cuestión y orientar las liberaciones según le corresponda. De esta manera, se podrá evitar el caso de finca Las Nubes. Del cual, se podría estudiar las probables repercusiones sobre el organismo a causa de liberaciones no orientadas en su genética.

## X. LITERATURA CITADA

- Alarcón, M., Arrivillaga, C., García, A., Gelera, R., Gonzalez, S., Mármol, A., Martínez, A., Moller, D., Moller, G., Sactic, M., Sagastume, V., Viteri, M., Braeuner, M., & Ariano-Sánchez, D. (2014) Evaluación ecológica rápida de la Reserva Natural Privada Finca Patrocinio, El Palmar, Quetzaltenango. Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala. 102 pp.
- Alfaro, A., Denyer, P., Alvarado, G. Gazel, E. y Chamorro, C. (2018). Estratigrafía y petrografía de las rocas ígneas en la Cordillera de Talamanca, Costa Rica. *Revista Geológica de América Central*. 58: 7- 36. DOI: 10.15517/rgac.v58i0.32669.
- Alfaro, M., Zoller, S. y Lutzoni, F. (2003). Bayes or Bootstrap? A simulation study comparing the performance of Bayesian Markov Chain Monte Carlo sampling and Bootstrapping in Assessing Phylogenetic confidence. *Molecular Biology and Evolution*. 20 (2): 255 – 266. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msg028>
- Álvarez-Yax, R., Bolaños-Alegría, A., Cabañas-Moscoso, S., Cardona-López, N., Coxaj-Álvarez, L., Gómez-Lemus, A., Gudiel-Tobias, J., Hernández-Fuentes, J., Juárez-Bolaños, A., Miranda-Medina, L., Pérez-Quan, K., Piedrasanta-López, J., Pimentel-Cifuentes, I., Ruiz-Villanueva, K., Saraccini-Ramírez, M., Tijerino-Escobar, D., Urizar, D., Villatoro-Castañeda, M. y Ariano-Sánchez, D. (2017). Evaluación ecológica rápida de la Reserva Natural Privada Finca Patrocinio, El Palmar, Quetzaltenango. Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala. 64 pp.
- Álvarez-Yax, R., Gómez-Lemus, A., Hernández-Fuentes, J., Juárez-Bolaños, A., Pérez-Quan, K., Tijerino-Escobar, D., Villatoro-Castañeda, M. y Ariano-Sánchez, D. (2018). Reproducción del falso vampiro lanudo *Chrotopterus auritus* (Chiroptera: Phyllostomidae) en un bosque tropical húmedo de la costa pacífica de Guatemala. *Acta Zoológica Mexicana*, 34, 1 – 3. DOI: <https://DOI.org/10.21829/azm.2018.3411190>
- Autoridad del Canal de Panamá. (2019). Reseña histórica del Canal de Panamá. Recuperado de: <https://micanaldepanama.com/historia-del-canal/resena-historica-del-canal-de-panama/>
- Awise, J. (1994). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York. 511 pp.
- Awise, J. y Hamrick, J. (1996). *Conservation genetics, case histories from nature*. Chapman and Hall, New York.

- Avise, J., Arnold, J., Ball, R., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. Reeb, C. y Saunders, N. (1987). Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489 – 522.
- Balvanera, P. (2012). Los servicios ecosistémicos que ofrecen los bosques tropicales. *Ecosistemas.* 21 (1 – 2), 136 – 147.
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P. Green, D., Cunnincham, A., Goggin, C., Slocombe, R., Ragan, M., Hyatt, A., McDonald, K., Hines, H., Lips, K., Marantelli, G. y Parkes, H. (1998). Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 9031 – 9036.
- Biswas, S. y Akey, J. (2006). Genomic insights into positive selection. *TRENDS in Genetics.* 22 (8): 437 – 447. DOI: doi:10.1016/j.tig.2006.06.005
- Bosch, J. (2003). Nuevas amenazas para los anfibios: enfermedades emergentes. *MUNIBE.* 16, 57 – 73.
- Campbell, N. y Reece, J. (2007). *Biología.* Editorial Médica Panamericana. 1532 pp.
- Cano, E., Schuster, J. y Morrone, J. (2018). Phylogenetics of *Ogyges* Kaup and the biogeography of Nuclear Central America (Coleoptera, Passalidae). *ZooKeys.* 737: 81 – 111. DOI: 10.3897/zookeys.737.20741
- Carrillo, S. (2014). *Genética de poblaciones de Artibeus jamaicensis en dos bosques de mangle de la costa sur de Guatemala, Tecojate y Monterrico.* Guatemala: Universidad del Valle de Guatemala.
- Castresana, J. (2001). Cytochrome *b* phylogeny and the taxonomy of Great Apes and Mammals. *Molecular Biology and Evolution.* 18 (4): 465 – 471. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003825>
- Checa, M. (2007). Polimorfismos genéticos: importancia y aplicaciones. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* 20 (3): 213 – 221.
- Clark, A. (2001). *Encyclopedia of Genetics, Population Genetics.* Academic Press. 1513 – 1519 pp. DOI: <https://doi.org/10.1006/rwgn.2001.1016>
- Crawford, A. (2009). Lab – Coalescent simulation using SIMCOAL. Recuperado de: [http://dna.ac/filogeografia/labs/Lab\\_SIMCOAL\\_Topicos\\_Crawford\\_2009.pdf](http://dna.ac/filogeografia/labs/Lab_SIMCOAL_Topicos_Crawford_2009.pdf)
- Díaz – García, J., Oropeza – Sánchez, M. y Aguilar – López, J. (2019). Servicios ecosistémicos de los anfibios en México: un análisis de diversidad, distribución y conservación. *Revista Etnobiología.* 17, 49 – 60.
- Dicyt (Agencia Iberoamericana para la difusión de la ciencia y la tecnología). (2019). La quitridiomycosis llega a la frontera de Darién. Recuperado de: <https://www.dicyt.com/viewNews.php?newsId=22019>

- Dodd, C. (2010). *Amphibian Ecology and Conservation, A Handbook of Techniques*. Oxford University Press, United Kingdom. 562 pp.
- Domínguez – Domínguez, O. y Vázquez – Domínguez, E. (2009). Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation* 32.1.
- Duellman, W. (1970). *The Hylid frogs of Middle America*. University of Kansas Museum of Natural History, Lawrence, Kansas
- Duellman, W. y Campell, A. (1982). A new frog of the genus *Ptychohyla* (Hylidae) from the Sierra de las Minas, Guatemala. *Herpetologica*. 38: 374-380
- Duellman, W. y Zug, G. (2019). Anura, Amphibian order. Recuperado de: <https://www.britannica.com/animal/Anura/Classification>
- Duro, J., Monzón, R., Vázquez, R., González, G., García, G., Argueta, J. y González, O. (2005). Atlas temático de la república de Guatemala. MAGA, unidad de planificación geográfica y gestión de riesgo – UPGGR –.
- Elston, R. y Stewart, J. (1971). A general model for the genetic analysis of pedigree data. *Hum Hered.* 21, 523 – 542. DOI: 10.1159/000152448
- Emerson, H. y Norris, C. (1905). “Red – leg”- an infectious disease of frogs. *The Journal of experimental medicine*. 7 (1), 32 – 58. DOI: 10.1084/jem.7.1.32
- Esparza, C. (2015). Efecto del Último Máximo Glacial sobre la diversidad genética de la rana moteada *Batrachyla leptopus* Bell, 1843 (Batrachylidae). Tesis de Ingeniería. Universidad Austral de Chile.
- Estrella, J., Manosalvas, R., Mariaca, J. y Ribadeneira, M. (2005). Biodiversidad y recursos genéticos: una guía para su uso y acceso en el Ecuador. Producciones Digitales Abya – Yala. 116 pp. Recuperado de: <https://www.portalces.org/sites/default/files/migrated/docs/Biodiversidadyrecursosgeneticos1.pdf>
- Faivovich, J. García, P., Ananias, F., Lanari, L., Basso, N. y Wheeler, W. (2004). A molecular perspective on the phylogeny of the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 32 (3), 938 – 950. DOI: 10.1016/j.ympev.2004.03.008
- FAO. (2017). Marcadores moleculares: una herramienta para explorar la diversidad genética. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/a1250s/a1250s17.pdf>
- FAO. (2019). El trabajo de la FAO sobre la biodiversidad. Recuperado de: <http://www.fao.org/publications/highlights-detail/es/c/1181484/>
- FAO. (2020). Estado actual de la información sobre arboles fuera del bosque. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/ad395s/ad395s04.htm>

- FAO. (2020). Perfil general de Honduras. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/ac768s/AC768S02.htm#:~:text=Honduras%20tiene%20como%20limites%20geogr%C3%A1ficos,y%20al%20Oeste%20con%20Guatemala.&text=Honduras%20posee%20una%20extensi%C3%B3n%20total%20de%20costas%20de%20820%20km>.
- FAO. (2020). Perfil general de Nicaragua. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/ad666s/ad666s03.htm#:~:text=Nicaragua%20esta%20ubicada%20en%20el,oeste%20con%20el%20Oc%C3%A9ano%20Pac%C3%ADfico>.
- Florez, A. (2009). Estructura poblacional y filogeografía de *Cucurbita moschata*. Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Recuperado de: <http://bdigital.unal.edu.co/1873/1/7508504.2009.pdf>
- Glorioso, B. y Waddle, J. (2014). A review of pipe and bamboo artificial refugia as sampling tolos in anuran studies. *Herpetological Conservation and Biology*. 9 (3): 609 – 625.
- Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático. (2002). Cambio climático y biodiversidad. Recuperado de: <https://archive.ipcc.ch/pdf/technical-papers/climate-changes-biodiversity-sp.pdf>
- Gual, J. y Colino, F. (2011). El concepto de extinción en el Cuaternario. *Ab Initio*. (4): 1 – 11.
- Haig, S. (1998). Molecular contributions to Conservation. *Ecology*. 79 (2), 413 – 425.
- Heying, H. (2003). Anura. Recuperado de: <https://animaldiversity.org/accounts/Anura/>
- Hickman, C., Roberts, L. y Larson, A. (1998). Biology of Animals. WCB/McGraw – Hill. 766 pp.
- Huang, A., Li, H., Luo, H., Ni, Q., Yao, Y., Xu, H., Zeng, B., Li, Y., Wei, Z. y Zhang, M. (2019). The complete mitochondrial genome of the tree frog, *Polypedates braueri* (Anura, Rhacophoridae). *Mitochondrial DNA part 8*. 4 (1): 1739 – 1740. DOI: <https://doi.org/10.1080/23802359.2019.1607594>
- Iglesias, V. (2008). Estudio multidisciplinar de la variabilidad del ADN mitocondrial en poblaciones humanas. Universidad de Santiago de Compostela.
- Instituto Nacional de Estadística (INE). (2010). Boletín informativo departamento de Alta Verapaz. Recuperado de: <https://www.ine.gob.gt/sistema/uploads/2013/12/10/AW55mn7rO16U1rznaFgMmcE0DSVXTJjd.pdf>
- Instituto Nacional de Estadística (INE). (2010). Boletín informativo departamento de Suchitepéquez. Recuperado de: <https://www.ine.gob.gt/sistema/uploads/2013/12/10/XA2LQ4BgERmGkvCugX4YXK50mWSE0g56.pdf>
- IUCN. (2020). The IUCN Red List of Threatened Species, versión 2020-2. Recuperado de: <https://www.iucnredlist.org/>

- IUCN SSC Amphibian Specialist Group. (2017). *Agalychnis moreletii*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2017. DOI: [http://dx.DOI.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T55293A53951672.en](http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T55293A53951672.en)
- IUCN SSC Amphibian Specialist Group. (2019). *Batrachyla leptopus*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2019. DOI: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-1.RLTS.T56332A79812006.en>
- IUCN SSC Amphibian Specialist Group. (2020). *Agalychnis callidryas*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2020. DOI: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-1.RLTS.T55290A3028059.en>.
- IUCN SSC Amphibian Specialist Group. (2020). *Ptychohyla hypomykter*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2020. DOI: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-2.RLTS.T55911A146928279.en>.
- Johnston, H., Keats, B. y Sherman, S. (2019). Emery and Rimoin's principles and practice of medical genetics and genomics; Population genetics. Academic Press. 359 – 373 pp. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812537-3.00012-3>
- Jong, M., Wahlberg, N., Eijk, M., Brakefield, P. y Zwaan, B. (2011). Mitochondrial DNA Signature for Range-Wide Populations of *Bicyclus anynana* Suggests a Rapid Expansion from Recent Refugia. *PLOS ONE*. 6 (6): e21385. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021385>
- Köhler, G. (2011). Amphibians of Central America, Offenbach, Germany: Herpeton Verlag, pp 379.
- Kretzmann, M., Gilmartin, W., Meyer, A., Zegers, G., Fain, S., Taylor, B. y Costa, D. (1997). Low genetic variability in the Hawaiian Monk Seal. *Conservation Biology*. 11 (2): 482 – 490.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. y Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35 (6), 1547 – 1549. DOI: 10.1093/molbev/msy096
- Lande, R. (1999). Extinction risk from anthropogenic, ecological and genetic factors. Princeton University Press, New Jersey.
- Landweber, L. y Dobson, A. (1999). Genetics and the extinction of species. DNA and Conservation of biodiversity. Princeton University Pres, New Jersey. 189 pp.
- Lanteri, A., Loíacono, M. y Margaría, C. (2002). Aportes de la biología molecular a la conservación de los insectos. Marco sistemático del proyecto PRIBES.
- Leenders, T. (2001): A guide to Amphibians and reptiles of Costa Rica. Zona Tropical, Miami.
- Leigh, J. W. y Bryant, D. (2015). PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol* 6(9):1110–1116.

- Lips, K., Burrowes, P., Mendelson, J. y Parra – Olea, G. (2005). Amphibian Population Declines in Latin America: A synthesis. *Biotropica*. 37 (2), 222 – 226. DOI: 10.1111/j.1744-7429.2005.00029.
- Loo, J. (2011). Manual de genética de la conservación: principios aplicados de genética para la conservación de la diversidad biológica. 1 ed. Semarnat. México.
- Lopera, N., Ribeiro, R., Sirol, R., Povh, J., Gomes, P., Streit Jr, D. y Vargas, L. (2008). Caracterización genética de lotes de *Brycon orbignyanus* utilizados en programas de repoblamiento. *Revista MVZ Córdoba*. 13 (1), 1110 – 1119.
- Los Tarrales Natural Reserve. (2020). All about Los Tarrales. Recuperado de: <https://es.tarralesreserve.com/reserve>
- Madrigal – Valverde, K. (2017). Uso de herramientas para alineación de secuencias y creación de árboles filogenéticos para la determinación de especies. *Tecnología en Marcha*. 4, 30 – 34.
- Martel, A., Spitzen – van, A., Blooi, M., Bert, W., Ducatelle, R., Fisher, M., Woeltjes, A., Bosman, W., Chiers, K., Bossuyt, F. y Pasmans, F. (2013). *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. Causes lethal chytridiomycosis in amphibians.
- Martínez, D. (2008). Diversidad genética y establecimiento de prioridades en esquemas de conservación, ejemplo de aplicación en la raza de Lidia. Tesis de doctorado. Universidad Complutense de Madrid. *PNAS*. 110 (38), 15325 – 15329. DOI: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1307356110](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1307356110)
- McCranie, J. y Wilson, L. (1993). Taxonomic Changes Associated with the Names *Hyla spinipollex* Schmidt and *Ptychohyla merazi* Wilson and McCranie (Anura: Hylidae). *The Southwestern Naturalist*. 38 (2): 100 -104.
- Mejía, H. y Rojas, D. (2017). La conciencia ambiental en Costa Rica: evolución, estado actual y retos futuros: sistematización del proceso de mejoramiento de la conciencia ambiental de Costa Rica. MINAE, SINAC. San José, Costa Rica. 103 pp.
- Mendoza – Revilla, J. Aportes de la filogenética a la investigación médica. *Rev. Med. Hered.* 23 (2): 119 – 127.
- Menin, M. y Giaretta, A. (2006). Predation on foam nests of *leptodactyline* frogs (Anura: Leptodactylidae) by larvae of *Beckeriella niger* (Diptera: Ephydriidae). *Journal of Zoology* 261 (3), 239 – 243. DOI: 10.1017/S0952836903004138
- Mesquite. (2019). Managing Molecular Data. Recuperado de: <https://www.mesquiteproject.org/Managing%20Molecular%20Data.html#fusing>
- Miller, R. y Fowler, M. (2015). *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine*. Saunders, Missouri United States. 792 pp. DOI: <https://DOI.org/10.1016/B978-1-4557-7397-8.00084-0>
- Ministerio de Asuntos Exteriores, Unión Europea y Cooperación. (2020). El Salvador. Recuperado de:

[http://www.exteriores.gob.es/Documents/FichasPais/ELSALVADOR\\_FICHA%20PAIS.pdf](http://www.exteriores.gob.es/Documents/FichasPais/ELSALVADOR_FICHA%20PAIS.pdf)

- Ministerio de Economía. (2017). Perfil departamental Alta Verapaz. Recuperado de: [https://www.mineco.gob.gt/sites/default/files/alta\\_verapaz\\_4.pdf](https://www.mineco.gob.gt/sites/default/files/alta_verapaz_4.pdf)
- Ministerio de Economía. (2017). Perfil departamental Quetzaltenango. Recuperado de: <http://www.mineco.gob.gt/sites/default/files/quetzaltenango.pdf>
- Ministerio de Economía. (2017). Perfil departamental Zacapa. Recuperado de: [https://www.mineco.gob.gt/sites/default/files/zacapa\\_0.pdf](https://www.mineco.gob.gt/sites/default/files/zacapa_0.pdf)
- Monge – Nájera, J. (2002). Biología General. EUNED. Universidad Estatal a Distancia, Costa Rica.
- Montero, J., Montero, M. C., Leyba, C. y Pallás, T. (2005). Polimorfismos genéticos en la sepsis. *Med. Intensiva*. 29 (3): 185 – 191. DOI: 10.1016/S0210-5691(05)74226-1
- Morera, B. y Jiménez, J. (2017). Primer reporte de *Agalychnis callidryas* (Hylidae) en la Reserva Biológica Alberto Manuel Brenes. *Revista Pensamiento actual*. 17 (1): 59 – 60.
- Moritz, C., Schneider, C. y Wake, D. (1992). Evolutionary relationships within the *Ensatina eschscholtzii* complex confirm the ring species interpretation. *Syst. Biol.* 41 (3), 273 – 291.
- Municipalidad de Guatemala. (2020). Situación territorial de la Ciudad de Guatemala. Recuperado de: [http://pot.muniguatemala.com/docts\\_soporte/01\\_situacion\\_territorial.php](http://pot.muniguatemala.com/docts_soporte/01_situacion_territorial.php)
- Olsina, C., Cairo, C. y Pessino, S. (2012). Desarrollo de una base de datos genéticos para la caracterización del germoplasma argentino de soja. *Ciencias Agronómicas*. 20, 23 – 39.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2016). La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/a1250s/a1250s20.pdf>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2020). Diversidad biológica. Recuperado de: <https://www.who.int/globalchange/ecosystems/biodiversity/es/>
- Ospina, SP., Landínez, RM., Rodríguez, DJ. Arango, R. y Márquez, E. (2008). Conectividad genética de *Stegastes partitus* en el Caribe Sur evidenciada por análisis microsatélite. *Cienc. Mar.* 34 (2): 155 – 163.
- Palumbi, S., Martin, A., Romano, S., McMillan, W., Stice, L. y Grabowski, G. (2002). The simple fool's guide to PCR. Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory. Universidad de Hawaii.
- Paternina, L., Verbel – Vergara, D. y Bejarano, 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 (2). DOI: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.3116>
- Pierce, B. (2009). *Genética: un enfoque conceptual*. Ed. Médica Panamericana. Madrid, España.
- Prychitko, T. y Moore, W. (2000). Comparative Evolution of the Mitochondrial Cytochrome *b* Gene and Nuclear  $\beta$ -Fibrinogen Intron 7 in Woodpeckers. *Molecular Biology and Evolution*. 17: 1101 – 1111. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026391>
- Rambaut, A. (2007). Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology. Recuperado de: <https://www.webcitation.org/getfile?fileid=27177ee8dd2f34cfd254b9c5e6c6fdf4b65329f6>
- Ramírez, A. (1998). Inventario y plan de manejo de la finca Sac Wach Já II. Alta Verapaz: San Cristóbal.
- Randall, A., Inouye, B., Johnson, M., Underwood, N. y Vellend, M. (2008). Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology letters*. 11: 609 – 623. DOI: [10.1111/j.1461-0248.2008.01179.x](https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01179.x)
- Reques, R. (2012). Programa de actuaciones para la conservación de los anfibios amenazados de Andalucía, fase II. Unión Europea.
- RNP Patrocinio. (2018). Catástrofes Naturales. Recuperado de: <https://reservapatrocinio.com/historia-y-caracteristicas-generales/>
- Roberts, W. (1994). Explosive breeding aggregations and parachuting in a Neotropical frog, *Agalychnis saltator* (Hylidae). *J. Herpetol.* 28: 193 – 199.
- Robertson, J. y Zamudio, K. (2009). Genetic diversification, vicariance, and selection in a polytypic frog. *Journal of Heredity*. 100 (6): 715 – 731. DOI: [10.1111/j.1365-3113.2009.04381.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2009.04381.x)
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J., Teslenko, M. y Nylander, J. (2019). MrBayes version 3.2 Manual: Tutorials and Model Summaries.
- Rosero – Galindo, C., Montenegro – Coral, F. y García – López, J. (2015). Marcadores moleculares como herramientas en la identificación y análisis genético de especies vectores de interés en salud pública, género *Lutzomyia* (Grupo *Verrucarum* Theodor, 1965). Universidad y Salud. 138 – 155.
- Rozas, P. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. Vol. 25. 1451 - 1452
- Sáez, A. (2009). Genes y especies. *Ecosistemas*. 18 (1): 3 – 9.
- Savage, J. (2002): *The amphibians and reptiles of Costa Rica*. University of Chicago. Press, Chicago and London, Estados Unidos.
- SICA (Sistema de la Integración Centroamericana). (2020). República de Honduras. Recuperado de: <https://www.sica.int/miembros/hn/territorio.aspx>

- SICA (Sistema de la Integración Centroamericana). (2020). República de Nicaragua. Recuperado de: <https://www.sica.int/miembros/ni/territorio.aspx>
- Solano, J. y Villalobos, R. (2000). Regiones y subregiones climáticas de Costa Rica. Recuperado de: [http://files.hidrico.webnode.es/200000078-47c7448c16/Reg\\_climaCR.pdf](http://files.hidrico.webnode.es/200000078-47c7448c16/Reg_climaCR.pdf)
- Solórzano, J. (2009). Actualización de la monografía del municipio de Escuintla, departamento de Escuintla. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Soltis, D., Soltis, P. y Doyle, I. (1998). Molecular systematics of plants II, DNA sequencing. Kluwer Academic Publishers Boston, London.
- Soria, A. (2018). Estandarización de Primers Específicos y Análisis de Diversidad Genética de *Psidium galapageium* en la isla Santa Cruz, Galápagos. Tesis de Licenciatura. Universidad San Francisco de Quito USFQ.
- Stuart, S., Chanson, J., Cox, N., Young, B., Rodrigues, A., Fischman, D. y Waller, R. (2004). Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science*. 306, 1783 – 1786.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 123: 585 – 595.
- The Gale Group. (2006). Amphibians. Recuperado de: <http://www.scienceclarified.com/Al-As/Amphibians.html>
- Tobar, M. y Gramajo, G. (2007). Plan de prevención y mitigación de desastres para la cabecera municipal de Olintepeque, Quetzaltenango. Guatemala: USAC. Recuperado de: <http://desastres.usac.edu.gt/documentos/docgt/pdf/spa/doc0187/doc0187.pdf>
- Torrades, S. (2002). Diversidad del genoma humano: los polimorfismos. *OFFARM*. 21 (5): 122 – 125.
- UPIE – MAGA y MAGA – BID. (2001). Mapa fisiográfico – geomorfológico de la República de Guatemala a escala 1:250,000 – memoria técnica –. Recuperado de: <https://www.maga.gob.gt/download/fisiografia.pdf>
- Valencia – Aguilar, A., Cortés – Gómez, A. y Ruiz – Agudelo, C. (2013). Servicios ecosistémicos brindados por los anfibios y reptiles del Neotrópico: una visión general. Recuperado de: <http://www.conservation.org.co/media/refledos.pdf>
- Vasquez, L. (2011). Detección de *Batrachochytrium dendrobatidis* en el ensamblaje de anfibios en la región andina central, oriental, orinoquia y amazonia de Colombia y el estudio in-vitro de la acción antagónica de la bacteria *Janthinobacterium lividum* frente a la cepa colombiana de *Batrachochytrium dendrobatidis*. Tesis de Maestría. Potificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Vázquez, E., Castañeda, S., Garrido, T. y Gutiérrez, T. (2009). Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 82: 277-297.

- Vázquez, R., Gómez, F. y Malo, L. (1995). Aportación del ADN mitocondrial en el estudio filogenético de las poblaciones indígenas de América. *An. Antrop.* 32: 73 – 82.
- Vences, M., Thomas, M., Meijden, A., Chiari, Y., y Vieites, D. (2005). comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology.* 2 (5). DOI: <https://doi.org/10.1186/1742-9994-2-5>
- Villa, J. (1972): Amphibians of the Corn Islands, Caribbean Nicaragua. *Carib. J. Sci.* 12(3-4): 195-197.
- Waples, R. (1995). Evolutionarily significant units and the conservation of biological diversity under the Endangered Species Act. *American Fisheries Soc. Symp.* 17: 8–27.
- Wilson, L. y McCranie, J. (2004): The conservation status of the herpetofauna of Honduras. *Amphib. Rept. Conserv.* 3(1): 6-33.
- Wright, S. (1951). The genetical structure of population. *Annals of Eugenics.* 15: 323 – 354.
- Wright, S. (1978). Evolution and the Genetics of Populations. *Variability Within and Among Natural Populations.* Vol. 4. University of Chicago Press, Chicago.
- Yang, L., Tan, Z., Wang, D., Xue, L., Guan, M. X., Huang, T. y Li, R. (2014). Species identification through mitochondrial rRNA genetic analysis. *Scientific reports.* 4: 4089. DOI: 10.1038/srep04089
- Zumbado, H. (2009). Detección de *Batrachochytrium dendrobatidis* en anuros del bosque tropical seco de costa rica y monitoreo de la población de *Craugastor ranoides* (Anura: Craugastoridae) en la península de Santa Elena. Tesis de maestría. Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

## XI. APÉNDICE

**Apéndice 1.** Cantidad de secuencias utilizadas de zonas de Guatemala y El Salvador para el análisis de *Agalychnis moreletti* de los genes mitocondriales 16S y Cyt b. Para 16S se analizaron secuencias de 544 nucleótidos de largo, y para cytb de 788 nucleótidos de largo.

Área	Gen 16S	Gen Cyt <i>b</i>
<b>RNP Patrocinio, Quetzaltenango (GT)</b>	10	11
<b>RNP Pamac, Alta Verapaz (GT)</b>	9	8
<b>Finca Dulce Rocío, Zacapa (GT)</b>	4	4
<b>Finca La Gracia, Escuintla (GT)</b>	6	6
<b>Reserva natural Tarrales, Suchitepéquez (GT)</b>	6	5
<b>Los Andes, Suchitepéquez (GT)</b>	3	4
<b>Las Nubes, Alta Verapaz (GT)</b>	10	11
<b>El Naranjo, Guatemala (GT)</b>	1	1
<b>Los Andes, El Salvador (SV)</b>	6	10
<b>Total</b>	55	60

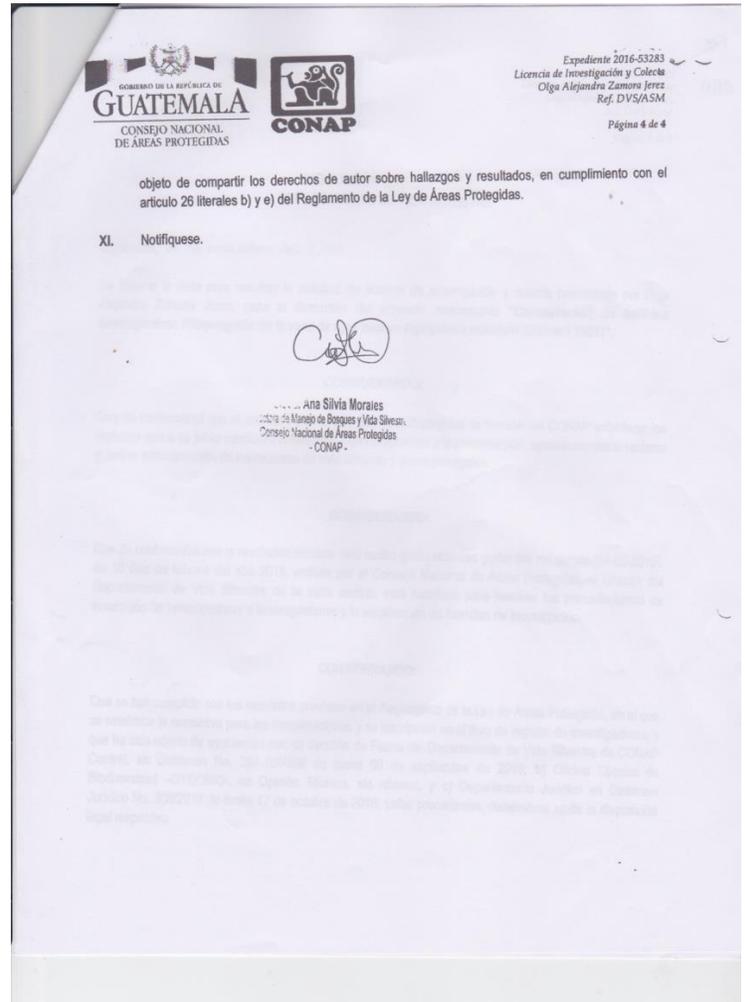
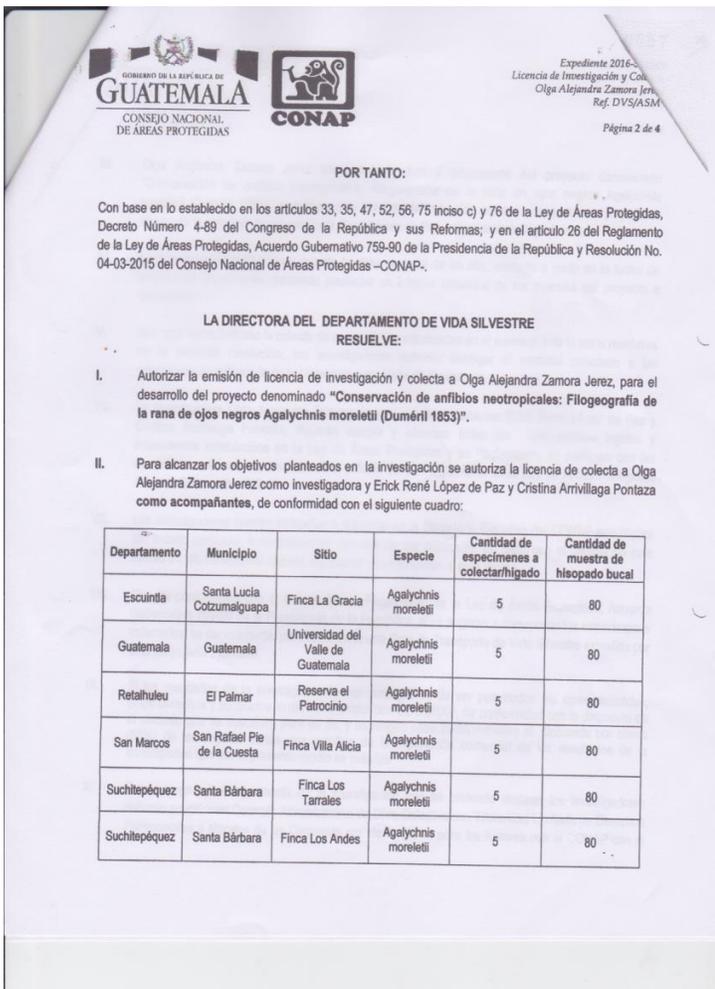
**Apéndice 2.** Cantidad de secuencias utilizadas de zonas de Costa Rica y Panamá para el análisis de *Agalychnis callidryas* del gen mitocondrial 16S. Se analizaron secuencias de 1149 nucleótidos de largo

Área	Gen 16S
Uvita, Puntarenas (CR)	8
Tilaran, Guanacaste (CR)	3
San Ramón, Alajuela (CR)	2
Siquirres, Heredia (CR)	1
Sierpe, Puntarenas (CR)	4
Santa Fe, Veraguas (PA)	2
Playa Bandera, Puntarenas (CR)	8
Pavones, Puntarenas (CR)	4
Reserva Cabo Blanco, Puntarenas (CR)	4
Manzanillo, Limon (CR)	6
Estación La Selva Biológica, Heredia (CR)	6
Gamboa, Panamá (PA)	4
El Valle, Coclé (PA)	3
Universidad Earth, Heredia (CR)	4
Parque Nacional El Cope, Coclé (PA)	4
Chiriqui, Bocas del Toro (PA)	5
Rincón Osa, Puntarenas (CR)	4
Cahuita, Limon (CR)	3
Almirante, Bocas del Toro (PA)	1
<b>Total</b>	<b>76</b>

**Apéndice 3.** Cantidad de secuencias utilizadas de zonas de Honduras y Nicaragua para el análisis de *Ptychohyla hypomykter* del gen mitocondrial 16S. Se analizaron secuencias de 551 nucleótidos de largo.

Área	Gen 16S
Agua Buena, Olancho (HN)	1
PN Montana Botaderos, Olancho (HN)	1
PN Montana Santa Barbara, Santa Barbara (HN)	2
PN Montana Comayagua, Comayagua (HN)	6
Montana de Jacaleapa, Olancho (HN)	2
Pino Alto, PN Pico Pijol (HN)	15
PN Cusuco, Cortes (HN)	2
PN Cerro Azul Meambar, Comayagua (HN)	9
PN Cerro Azul Copán, Copán (HN)	1
PN Pico Pijol, Yoro (HN)	1
RN Penas Blancas, Jinotega (NI)	4
PN Saslaya, Jinotega (NI)	4
RN Cerro Kilambe, Jinotega (NI)	2
RP Selva Negra, Matagalpa (NI)	5
<b>Total</b>	<b>55</b>

## Apéndice 4. Licencia de investigación y colecta gestionada en el Consejo de Áreas Protegidas (CONAP) para *A. moreletii* en Guatemala.



**Apéndice 5. Renovación licencia de colecta gestionada en el Consejo de Áreas Protegidas (CONAP) para *A. moreletii* en Guatemala.**

CONSEJO NACIONAL DE AREAS PROTEGIDAS (CONAP)  
GUATEMALA, C.A.

Serie A Nº 004995

**LICENCIA DE COLECTA O APROVECHAMIENTO DE VIDA SILVESTRE**

1. Nombre o razón social: Olga Alejandra Zamora Jérez  
 Dirección: 2 calle 49-18 colonia Molino de las Flores 1, zona 2 de Mixco, Guatemala  
 Teléfono: 5567-8618 / 5309-2007 Identificación: DPI: 1936 91957 0101

2. Tipo de colecta: comercial \_\_\_\_\_ científica  aficionada \_\_\_\_\_

3. No. de registro: I-016-2009

4. Especies a colectar:

ESPECIES	CANTIDAD	FORMA
Agalychnis moreletii	30	Especímenes vivos
Agalychnis moreletii	50 muestras por sitio de colecta	Hisopado bucal
Agalychnis moreletii	40 muestras por sitio de colecta	Hisopado de piel

5. Ubicación de la colecta o aprovechamiento: Guatemala, Petén, Huehuetenango, Quiché, Alta Verapaz, Izabal, San Marcos, Quetzaltenango, Retalhuleu, Suchitepéquez, Escuintla, Sacatepéquez, Zacapa, Santa Rosa

6. Número de registro de la propiedad: No aplica

7. Técnicas de colecta autorizadas:

Colecta manual, colecta de saliva con hisopo de rayón estéril, frotado de piel con hisopo de rayón estéril

8. Nombre de colector(es) autorizado(s) e identificación:

Olga Alejandra Zamora Jérez (DPI: 1936 91957 0101)

9. Localidad de traspaso de material colectado:

Universidad del Valle de Guatemala y Universidad Metropolitana de Manchester

Lugar y fecha de emisión: Guatemala, 17 de agosto de 2018

Válido hasta: 17 de agosto de 2019

  
 Delegada CONAP



## Apéndice 6. Autorización de investigación y recolecta científica en áreas naturales protegidas gestionada en el Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales en El Salvador, para *A. moreletii*.

