

Reporte Final Beca TReeS 2009

Por: Karen Yvette Siu Ting Salvatierra

El presente reporte tiene como objetivo presentar resultados y avances del proyecto de investigación titulado “Variación geográfica de especies de anfibios de amplia distribución en la Amazonía del sureste de Perú”. Este proyecto busca integrar la información molecular, morfológica y ecológica para identificar especies nuevas de anfibios que han pasado “desapercibidas” como especies de amplia distribución en la Amazonía y es parte de la investigación que realizo para mi trabajo de tesis de maestría.

La cuenca amazónica abarca la tercera parte del área del continente sudamericano y alberga la mayor diversidad de vida en la tierra (Duellman 2005). La porción de cuenca amazónica en el Perú es la región con mayor diversidad de anfibios en el país (Rodríguez y Duellman 1994, Lehr 2002). En algunos sitios de la Amazonía se han realizado estudios exhaustivos de la diversidad de herpetofauna (Duellman 2005). Estos trabajos han permitido conocer la ocurrencia de especies de distribución amplia a lo largo de la Amazonía. Sin embargo, debido a la baja vagilidad y alta filopatría en anfibios, se esperaría que en este grupo haya una alta estructura geográfica y endemismos (Blaustein *et al.* 1994). A decir verdad, los casos de fragmentación geográfica y genética son tan comunes en anfibios tropicales que Wynn y Heyer (2001) han cuestionado si realmente existen las especies de anfibios tropicales con distribución amplia.

Los estudios de morfología son importantes para el reconocimiento y descripción de especies. Sin embargo, los datos morfológicos no siempre han sido suficientemente útiles, especialmente en casos donde los grupos de estudio presentan caracteres muy conservativos o donde los caracteres resultantes son el producto de una evolución convergente, como se da frecuentemente en los anfibios (Fouquet *et al.* 2007). La información de la genética molecular puede ayudar a revelar y delimitar linajes de evolución independiente (especies candidatas) dentro de un grupo de muestras con incertidumbre a nivel taxonómico. Además, permite obtener mayores evidencias que apoyen las investigaciones realizadas en campo sobre diversidad de especies y ayudan a acelerar el proceso del descubrimiento de especies (e.g., Köhler *et al.* 2005; Stuart *et al.* 2006).

Los trabajos en genética a nivel poblacional en anfibios de la Amazonía son relativamente recientes y han sido manejados con un enfoque integral al complementarse con datos genéticos, morfológicos y ecológicos. Algunos ejemplos de aplicación de estas técnicas como el de la rana *Physalaemus petersi* (Funk *et al.* 2007), el dendrobátido *Ameerega hahneli* (Twomey y Brown 2008) y tres ranas del género

Pristimantis (Elmer y Cannatella 2008) son prueba de que la genética está siendo una herramienta útil que al ser complementada con la historia natural y la morfología, ayudan a tener resultados rápidos y confiables para un mejor conocimiento de la taxonomía en anfibios, y por ende, de su diversidad. El uso de datos moleculares representa una herramienta importante para lograr estos objetivos.

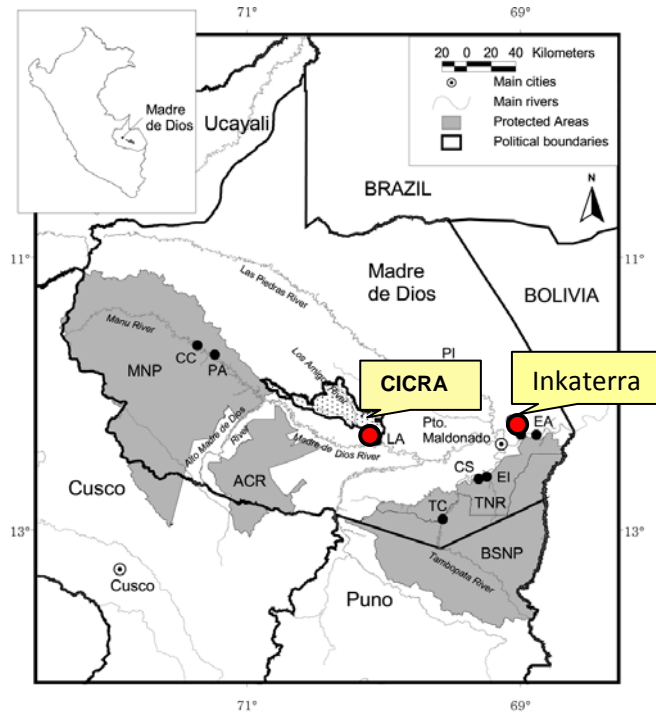
Una herramienta que está permitiendo el acceso a este tipo de estudios es el proyecto Barcode of Life (BOLD). La iniciativa del Barcode of Life (www.boldsystems.org/, Ratnasingham y Hebert 2007) tiene como objetivo fomentar el estudio de la caracterización genética a través de un sitio web que permite el acceso libre, depósito, análisis y publicación de las secuencias del gen Citocromo Oxidasa I (COI). Esta iniciativa busca integrar la taxonomía tradicional basada en datos morfológicos con técnicas genéticas y herramientas nuevas manejando los datos *en línea* (e.g., Hebert *et al.* 2003, DeSalle *et al.* 2005, Will *et al.* 2005, Hajibabaei *et al.* 2006, Ratnasingham y Hebert 2007). Las secuencias depositadas tanto en BOLD como en GenBank estarán a disposición gratuita para el público interesado. Los protocolos e información correspondiente a ese proyecto pueden ser consultados a través de su página web (BOLD, <http://www.boldsystems.org/>). Es en el marco de esta iniciativa que se trabajará los secuenciamientos para evaluar la variación geográfica local (a nivel de Madre de Dios) en algunas especies de amplia distribución para probar la ocurrencia de patrones de divergencia y descubrir especies morfológicamente “crípticas”.

Metodología

Etapas de Muestreo

Se hizo un trabajo de campo en dos localidades de la Amazonía de Perú con bosque conservado: la Estación Biológica Río Los Amigos (CICRA de ahora en adelante) (12°34' S, 70°06' W; 270 m) en la unión del Río Los Amigos y el Río Madre de Dios, en la Provincia de Manu, y Casa ITA, en el albergue Inkaterria en el Río Madre de Dios, Provincia de Tambopata, en el Departamento de Madre de Dios (ver Figura 1). Las evaluaciones de campo se hicieron: en el CICRA en enero del 2009, en 15 días de trabajo, y en Inkaterria en enero del 2010 en 10 días de trabajo. La beca TReeS otorgada me ayudó a cubrir los costos del trabajo de campo realizado en Casa ITA y algunos costos de la exportación de las muestras para su correspondiente análisis. No se pudo realizar otra salida a la otra localidad planeada, Río Las Piedras, porque no se logró un acuerdo para poder hacer la visita debido al traspaso del local a nuevos dueños.

Figura 1. Mapa de ubicación de la Estación Biológica Río Los Amigos (CICRA) y la Casa ITA, Inkaterra. (Mapa modificado de Von May *et al.* 2009).



El método para detección de las especies de anfibios que se utilizó es el de búsqueda por encuentro visual (VES) a manera de búsquedas libres. De cada espécimen se obtuvo una serie de fotografías y grabaciones de cantos cuando fue posible. Para la preparación de las muestras colectadas se sacrificó al individuo esparciendo una pequeña cantidad de Benzocaína al 8% sobre el dorso e ingles (en el caso de anuros pequeños) y se inyectó una pequeña cantidad de Halatal en el corazón (en el caso de anuros grandes). Para la obtención de las muestras de tejido para secuenciamiento de ADN, se extrajo una porción de hígado y músculo de los individuos sacrificados (usando pinzas y tijeras de disección esterilizadas) fijados en solución Dimetil sulfóxido (DMSO) o en alcohol al 96%. Luego, se fijaron los individuos en las posiciones sugeridas por Heyer *et al.* (1994), en formol al 10%. Posteriormente, se trasladaron los ejemplares a una solución de alcohol al 70% para su preservación final. Las muestras de renacuajos obtenidos se sacrificaron con anestésico local también y se extrajo tejido de la cola o del hígado. La larva se fijó en formol 10% (según Altig 1970) después de obtenida la muestra de tejido.

Se depositaron todos los tejidos obtenidos y el total de ejemplares vouchers colectados en la colección del Departamento de Herpetología del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (MUSM). Una copia de los tejidos fueron exportados a Estados Unidos para ser procesados en el Laboratorio de Biología Analítica del Instituto Smithsonian. Recién se hizo llegar el material a este laboratorio en el mes de mayo del 2010 y a la fecha se encuentra en etapa de procesamiento para la obtención del DNA.

Etapa de amplificación y secuenciamiento de los tejidos

Se hará el secuenciamiento del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI) y el gen de la subunidad ribosomal 16S (16S). Las secuencias obtenidas del DNA mitocondrial son las propuestas por el programa Barcode of Life (BOLD).

Revisión de los vouchers

La evaluación de las identidades de las especies así como su morfología se vienen llevando a cabo con la ayuda de un estereoscopio Nikon SMZ800 en las instalaciones del Departamento de Herpetología del MUSM. Para la identificación de las especies se utilizó la guía de anfibios por Von May *et al.* (2007) y las descripciones de especies en el trabajo de Duellman (2005). Además, se utilizaron especímenes de la colección del MUSM para comparar.

Resultados

Se colectó un total de 36 especies en la primera localidad, el CICRA y un total de 31 especies en la segunda localidad evaluada, albergue Inkaterra (ver Tabla 1). De las especies colectadas, 17 estaban presentes en ambas localidades visitadas, éstas son: *Rhinella* cf. *margaritifer*, *Ameerega hahneli*, *Dendropsophus koechlini*, *Hypsiboas fasciatus*, *H. geographicus*, *Phrynohyas venulosa*, *Scarthyla goinorum*, *Scinax garbei*, *S. icterica*, *S. ruber*, *Sphaenorhynchus lacteus*, *Edalorhina perezii*, *Leptodactylus petersii*, *Chiasmocleis ventrimaculata*, *Hamptophryne boliviana*, *Pristimantis reichlei* y *P. toftae*.

Tabla 1. Especies registradas en la Estación Biológica CICRA (enero del 2009) y en el albergue Inkaterra (enero del 2010).

Orden	Familia	Género	Especie	Localidades	
				CICRA	Inkaterra
Anura	Bufoidea	<i>Rhinella</i>	cf. <i>margaritifer</i>	X	X
Anura	Bufoidea	<i>Rhinella</i>	<i>marina</i>		X
Anura	Bufoidea	<i>Dendrophryniscus</i>	<i>minutus</i>	X	

Anura	Dendrobatidae	<i>Allobates</i>	<i>conspicuus</i>	X	
Anura	Dendrobatidae	<i>Allobates</i>	<i>femoralis</i>		X
Anura	Dendrobatidae	<i>Allobates</i>	<i>trilineatus</i>		X
Anura	Dendrobatidae	<i>Ameerega</i>	<i>hahneli</i>	X	X
Anura	Dendrobatidae	<i>Ameerega</i>	<i>trivittata</i>	X	
Anura	Hylidae	<i>Dendropsophus</i>	<i>acreatus</i>		X
Anura	Hylidae	<i>Dendropsophus</i>	<i>allenorum</i>		X
Anura	Hylidae	<i>Dendropsophus</i>	<i>koehlini</i>	X	X
Anura	Hylidae	<i>Dendropsophus</i>	<i>leucophyllatus</i>		X
Anura	Hylidae	<i>Dendropsophus</i>	<i>minutus</i>		X
Anura	Hylidae	<i>Dendropsophus</i>	<i>parviceps</i>	X	
Anura	Hylidae	<i>Dendropsophus</i>	<i>punctatus</i>		X
Anura	Hylidae	<i>Dendropsophus</i>	<i>rhodopeplus</i>	X	
Anura	Hylidae	<i>Dendropsophus</i>	<i>schubarti</i>		X
Anura	Hylidae	<i>Dendropsophus</i>	<i>triangulum</i>	X	
Anura	Hylidae	<i>Hypsiboas</i>	<i>cinerascens</i>	X	
Anura	Hylidae	<i>Hypsiboas</i>	<i>fasciatus</i>	X	X
Anura	Hylidae	<i>Hypsiboas</i>	<i>geographicus</i>	X	X
Anura	Hylidae	<i>Hypsiboas</i>	<i>lanciformis</i>	X	
Anura	Hylidae	<i>Osteocephalus</i>	<i>taurus</i>		X
Anura	Hylidae	<i>Phrynohyas</i>	<i>venulosa</i>	X	X
Anura	Hylidae	<i>Phyllomedusa</i>	<i>camba</i>	X	
Anura	Hylidae	<i>Phyllomedusa</i>	<i>palliata</i>	X	
Anura	Hylidae	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	X	
Anura	Hylidae	<i>Scarthyla</i>	<i>goinorum</i>	X	X
Anura	Hylidae	<i>Scinax</i>	<i>garbei</i>	X	X
Anura	Hylidae	<i>Scinax</i>	<i>icterica</i>	X	X
Anura	Hylidae	<i>Scinax</i>	<i>pedromedinae</i>	X	
Anura	Hylidae	<i>Scinax</i>	<i>ruber</i>	X	X
Anura	Hylidae	<i>Sphaenorhynchus</i>	<i>lacteus</i>	X	X
Anura	Leptodactylidae	<i>Edalorhina</i>	<i>perezi</i>	X	X
Anura	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus</i> (<i>Adenomera</i>)	<i>cf. hylaedactyla</i>		X
Anura	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus</i> (<i>Adenomera</i>)	sp.	X	
Anura	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus</i>	<i>bolivianus</i>		X
Anura	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus</i>	<i>dydimus</i>		X
Anura	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus</i>	<i>lineatus</i>	X	
Anura	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus</i>	<i>petersii</i>	X	X

Anura	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus</i>	<i>rhodomystax</i>	X	
Anura	Leptodactylidae	<i>Physalaemus</i>	<i>freibergeri</i>	X	
Anura	Microhylidae	<i>Chiasmocleis</i>	<i>ventrimaculata</i>	X	X
Anura	Microhylidae	<i>Hamptophryne</i>	<i>boliviana</i>	X	X
Anura	Strabomantidae	<i>Oreobates</i>	<i>cruralis</i>	X	
Anura	Strabomantidae	<i>Noblella</i>	<i>myrmecoides</i>	X	
Anura	Strabomantidae	<i>Pristimantis</i>	<i>buccinator</i>	X	
Anura	Strabomantidae	<i>Pristimantis</i>	<i>fenestratus</i>		X
Anura	Strabomantidae	<i>Pristimantis</i>	<i>reichlei (antes peruvianus)</i>	X	X
Anura	Strabomantidae	<i>Pristimantis</i>	sp. 1	X	
Anura	Strabomantidae	<i>Pristimantis</i>	<i>toftae</i>	X	X
<i>Total</i>				36	31

Discusión y Conclusiones

La mayoría de las especies compartidas encontradas son muy similares morfológicamente y haciendo una comparación simple mientras se identificaban, no presentan patrón de diferencias morfológicas. Los datos de los genes mitocondriales COI y 16S ayudarán a visualizar si hay alguna considerable distancia genética que permita indicar si las poblaciones podrían corresponder a entidades taxonómicas distintas (especies nuevas).

Algunas de las especies con problemas taxonómicos más complejos, como es el caso de *Rhinella margaritifera* y *Scinax ruber*, donde la morfología es muy conservada o no muestra patrones morfológicos definidos, la información de los genes mitocondriales podrá ayudar a ver el nivel de divergencia en las poblaciones. Para ambas especies, ya se ha reportado un estudio en la Guyana Francesa donde se distinguió al menos 11 linajes divergentes que podrían tratarse de especies nuevas (en *R. margaritifera*) y 6 linajes divergentes para el caso de *S. ruber* (Fouquet *et al.* 2007). A la fecha, de lo observado en nuestras muestras para las dos especies, la morfología externa de los especímenes de CICRA e Inkaterra para las dos especies no presentan patrones de morfología que las distinga entre sí.

Para el resto de las especies obtenidas, donde no hemos observado diferencias a nivel ecológico ni morfológico, sólo podemos esperar hasta obtener los resultados de los genes para definir el nivel de divergencia entre las poblaciones. Dichos resultados podrán estar disponibles en agosto del 2010.

Bibliografía

- Altig, R. 1970. A Key to the Tadpoles of the Continental United States and Canada. *Herpetologica*, 26: 180-207.
- Biodiversity Institute of Ontario: Barcode of Life Sata Systems (BOLD). [web application]. 2007. Ontario, Canada. Disponible en: <http://www.boldsystems.org/views/login.php>
- Blaustein, A., Wake, D. y Sousa, W. 1994. Amphibian declines – judging stability, persistence and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conservation Biology*, 8: 60-71.
- DeSalle, R., Egan, M., Siddall, M., 2005. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, series B*, 360: 1905-1916.
- Duellman, W. 2005. *Cusco Amazónico. The lives of amphibians and reptiles in an Amazonian rainforest.* Cornell University Press.
- Elmer, K. y Cannatella, D. 2008. Three new species of leaf litter frogs from the upper Amazon forests: cryptic diversity within *Pristimantis "ockendeni"* (Anura: Strabomantidae) in Ecuador. *Zootaxa*, 1784: 11–38
- Fouquet, A., Vences, M., Salducci, M.-D., Meyer, A., Marty, C., Blanc, M. y Gilles, A. 2007. Revealing cryptic diversity using molecular phylogenetics and phylogeography in frogs of the *Scinax ruber* and *Rhinella margaritifera* species groups. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43: 567–582.
- Funk, C., Caldwell, J., Peden, C., Padial, J. M., De la Riva, I. y Cannatella, D. 2007. Tests of biogeographic hypotheses for diversification in the Amazonian forest frog, *Physalaemus petersi*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44: 825–837.
- Hajibabaei, M., Janzen, D., Burns, J., Hallwachs, W., Hebert, P., 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103: 968-971.
- Hebert, P., Cywinska, A., Ball, S., deWaard, J., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London series B*, 270: 313-321.
- Heyer, R.; Donnelly, M., Mc Diarmid, R., Hayek, L. y Foster, M. (eds). 1994. *Measuring and Monitoring Biological Diversity, Standard Methods for Amphibians.* Smithsonian Institution Press.
- Köhler, J., Vieites, D., Bonett, R., García, F., Glaw, F., Steinke, D., y Vences, M. 2005. New amphibians and global conservation: A boost in species discoveries in a highly endangered vertebrate group. *BioScience*, 55: 693-969.
- Lehr, E. 2002. *Amphibien und Reptilien in Peru.* Natur-und Tier-Verlag. Münster.
- Ratnasingham, S., Hebert, P. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes* (disponible en línea como doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01678.)
- Rodríguez L. & W. Duellman. 1994. *Guide to the frogs of the Iquitos region, Amazonian Peru.* Special Publication Natural History Museum, University of Kansas. 22: 1-80, plates 1-12.
- Stuart, B., Inger, R. y Voris, H. 2006. High level of cryptic species diversity revealed by sympatric lineages of Southeast Asian forest frogs. *Biology Letters*, 2: 470-474.
- Twomey, E. y Brown, J. 2008. A partial revision of the *Ameerega hahneli* complex (Anura: Dendrobatidae) and a new cryptic species from the East-Andean versant of Central Peru. *Zootaxa*, 1757: 49–65.

- Von May, R.; Siu-Ting, K.; Jacobs, J.; Medina, M.; Gagliardi, G.; Rodríguez, L.; Donnelly, M. 2009. The amphibians of Los Amigos Research Center with comments on the conservation status of amphibians in Madre de Dios, Peru. *Herpetological Conservation and Biology*, 4:1 (14-29).
- Von May, R.; Rodríguez, L. 2004. Guía Fotográfica para los Anfibios del Centro Río Los Amigos, Madre de Dios, Perú. Asociación para la Conservación de la Cuenca Amazónica (ACCA).
- Will, K., Mishler, B., Wheeler, Q. 2005. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology*, 54: 844-851.
- Wynn, A. y Heyer, W. 2001. Do geographically widespread species of tropical amphibians exist? An estimate of genetic relatedness within the neotropical frog *Leptodactylus fuscus* (Schneider 1799) (Anura Leptodactylidae). *Tropical Zoology*, 14: 255–285.